



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Katedra laboratorních metod a informačních systémů (KLI)

Bakalářská práce

Identifikace vláknitých hub pomocí MALDI TOF hmotnostní spektrometrie

Autor práce: Martina Šnajdrová

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Hrabák, Ph.D.

České Budějovice 2014

Abstrakt

Metoda hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpční/ionizací za přítomnosti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI-TOF MS) využívá techniku tzv. měkké ionizace. Jedná se o rychle a stále se rozvíjející metodu, jenž našla uplatnění pro analýzu proteinů, glykoproteinů, nukleových kyselin, lipidů a vysokomolekulárních i nízkomolekulárních látek. Průlom přinesla tato metoda do rutinních mikrobiologických laboratoří. Pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie je možné provádět identifikaci aerobních i anaerobních bakterií, kvasinek, mykobakterií, ale též určit rod a druh vláknitých mikromycet. Kromě identifikace mikroorganismů je možné detekovat mechanismy antibiotické rezistence bakterií (např. β -laktamáz zodpovědných za inaktivaci β -laktamových antibiotik).

Jedná se o snadno použitelnou metodu identifikace, přesnější, rychlejší a nákladově efektivnější než dosud využívané biochemické testy a srovnání makroskopického a mikroskopického vzhledu. Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF analyzuje hmotnostní spektra proteinů (bakterie) a glykoproteinů (houby), která jsou druhově specifická pro zkoumaný a určovaný kmen. Určení kmene probíhá srovnáním získaného hmotnostního spektra s referenční databází spekter.

V období od ledna 2013 do února 2014 bylo v rámci praktické části vyšetřeno 114 izolátů vláknitých hub, přičemž 80 kmenů zachycených jako původci povrchových mykóz a 34 kmenů jako původci systémových a orgánových mykóz. Všechny 114 vzorků bylo určeno jak klasickými metodami identifikace, tak i pomocí MALDI TOF MS. Vybraná skupina izolátů byla porovnána s molekulárně genetickými metodami (PCR) s následnou sekvencí amplikonu.

MALDI TOF hmotnostní spektrometrie je jednoduchou metodou pro identifikaci bakterií. Při testování vláknitých mikromycet je kladen hlavní důraz na fázi přípravy vzorku před samotným testováním, bylo odzkoušeno několik pracovních postupů jejichž úspěšnost je shrnuta v této bakalářské práci.

Klíčová slova: vláknité houby, identifikace, MALDI TOF hmotnostní spektrometrie

Abstract

The method of mass spectrometry with laser desorption / ionization time of flight in the presence of the matrix analyzer (MALDI-TOF MS) is using a technique called soft ionization. This is a fast and ever-evolving method, which has found application for the analysis of proteins, glycoproteins, nucleic acids, lipids and high molecular weight and low molecular weight substances. This method has brought innovation to the routine microbiology laboratories. MALDI-TOF mass spectrometry can be used for identification aerobic and anaerobic bacteria, yeast, mycobacteria, but also to determine the genus and species of filamentous fungi. Except identification of microorganisms, is possible to detect the mechanisms of antibiotic resistance in bacteria (e.g., β - lactamases ability for the inactivation of β - lactam antibiotics).

MALDI TOF MS is an easy to use method more accurate, faster and more cost efficient than commonly used biochemical tests and comparing macroscopic and microscopic appearance. Mass spectrometry MALDI TOF generate mass spectra of proteins (bacteria) and glycoproteins (fungi), which are species -specific for identification of strain. Identification of the strain by comparing the obtained mass spectra with reference spectra databases .

In the period from January 2013 to February 2014 were in the practical part examined 114 isolates of filamentous fungi, 80 strains as agent of a superficial mycoses and 34 strains as agents of systemic and organ fungal infections. All 114 samples were determined by conventional methods and also were identified by MALDI TOF MS. The selected group of isolates was compared to molecular genetic methods (PCR) followed by the sequence of the amplicon. MALDI TOF mass spectrometry is a method for easily identifying bacteria. During testing of filamentous fungi is a main importance on the stage of preparation of the sample before testing. It was tried several workflows whose success is summarized in this thesis.

Keywords: filamentous fungi, identification, MALDI TOF mass spectrometry

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 5. 5. 2014

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem spolupracovníkům z Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice v Plzni, za pomoc, důvěru a pochopení. Jmenovitě bych ráda poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Hrabákovi Ph.D. za odborné vedení a za podnětné rady při zpracování mé bakalářské práce. Rovněž bych ráda poděkovala MUDr. Heleně Janouškovcové za pomoc a cenné informace z oblasti mykologie. Mgr. Vítu Hubkovi z katedry botaniky na Přírodovědecké fakultě UK za možnost využití jeho PCR výsledků pro srovnání. A v neposlední řadě MUDr. Evě Chudáčkové za pomoc s fotografickou dokumentací a Ing. Vendule Heringové za pomoc a podporu.

Obsah

ÚVOD.....	9
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA HUB	10
1.2 ZÁKLADNÍ MORFOLOGICKÉ ROZDĚLENÍ HUB.....	10
1.2.1 Kvasinky	10
1.2.2 Vláknité houby.....	11
1.2.3 Dimorfní houby.....	11
1.3 TAXONOMIE HUB	11
1.4 STAVBA BUŇKY VLÁKNITÝCH MIKROMYCET	13
1.5 ŽIVOTNÍ CYKLUS HUB	13
1.6 KLINICKY VÝZNAMNÉ VLÁKNITÉ HOUBY.....	14
1.6.1 Dermatofyta	14
1.6.2 Hyfomycety (septované hyalinní formy)	16
1.6.3 Hyfomycety (pigmentované dematiace formy).....	17
1.6.4 Zygomycety	17
1.7 ONEMOCNĚNÍ VYVOLANÁ VLÁKNITÝMI HOUBAMI.....	18
1.7.1 Povrchové mykózy.....	18
1.7.2 Orgánové mykózy	19
1.7.3 Systémové mykózy	19
1.8 ODBĚR MATERIÁLU PRO MYKOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ	19
1.8.1 Odběr materiálu při podezření na povrchové mykózy	19
1.8.2 Odběr materiálu při podezření na systémové a orgánové mykózy.....	20
1.9 ZPRACOVÁNÍ A KULTIVACE MATERIÁLU.....	20
1.9.1 Kultivace materiálu při podezření na povrchové mykózy.....	21
1.9.1.1 Kultivace	21
1.9.1.2 Mikroskopie.....	21
1.9.2 Kultivace materiálu při podezření na systémové mykózy.....	22
1.9.2.1 Kultivace	22
1.9.2.2 Mikroskopie.....	22
1.10 STANOVENÍ CITLIVOSTI NA ANTIMYKOTIKA.....	24
2. METODY IDENTIFIKACE VLÁKNITÝCH HUB	25
2.1 KLASICKÁ METODA IDENTIFIKACE VLÁKNITÝCH HUB	25
2.1.1 Laktofenolový preparát.....	25
2.1.2 Mikrokultivace (mikrokultura)	26
2.1.3 Izolace vláknité houby	26
2.1.4 Hodnocení klasické identifikace	27
2.2 PRŮKAZ MYKOTICKÉ DNA (IDENTIFIKACE 18S rDNA)	27
2.2.1 Namnožení genu 18S rDNA pomocí polymerázové řetězové reakce	28
2.2.2 Vyhodnocení PCR reakce	28
2.2.3 Sekvence	29
2.3 MALDI-TOF HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	29

2.3.1	Obecná charakteristika	29
2.3.2	Historie MALDI-TOF MS	29
2.3.3	Princip MALDI TOF MS.....	30
2.3.4	Matrice	31
2.3.5	Ionizace.....	32
2.3.6	MALDI TOF MS schematické zobrazení přístroje.....	33
2.3.7	Součásti hmotnostního spektrometru	34
2.3.7.1	Systém vakua hmotnostního spektrofotometru	34
2.3.7.2	Systém laseru hmotnostního spektrometru	34
2.3.7.3	Reflektor (bezmřížkový reflektor s iontovými čočkami).....	34
2.3.7.4	Detektor (dva MPC detektory zapojené v sérii)	35
2.3.7.5	Průletový analyzátor TOF (analyzátor doby letu)	35
2.3.7.6	Digitizér.....	35
2.3.7.7	MSP terčik.....	35
2.3.8	Identifikace neznámého vzorku a určení skóre vzorku	36
2.3.9	MALDI TOF MS identifikace infekčního agens	37
3.	CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	40
4.	PRAKTICKÁ ČÁST	41
4.1	POMŮCKY.....	41
4.1.1	Materiálové a přístrojové vybavení.....	41
4.1.2	Kultivační půdy.....	41
4.1.3	Chemikálie	42
4.1.4	Roztok matrice pro MALDI TOF MS stanovení	42
4.2	METODIKA ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ PŘED MALDI TOF MS ANALÝZOU	42
4.2.1	Pracovní postup I.	42
4.2.2	Alternativní pracovní postupy.....	45
4.2.2.1	Pracovní postup II.	45
4.2.2.2	Pracovní postup III.	46
4.2.3	Hodnocení použitých metod přípravy vzorků.....	46
5.	VÝSLEDKY A HODNOCENÍ	47
5.1	HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ MALDI TOF MS.....	47
5.1.1	Kmeny vláknitých hub vyvolávající orgánové nebo systémové mykózy	47
5.1.1.1	Výsledky.....	48
5.1.1.2	Hodnocení	48
5.2.1	Kmeny vláknitých hub vyvolávající povrchové mykózy	48
5.2.1.1	Výsledky.....	49
5.2.1.2	Hodnocení	49
5.3	SROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ KLASICKÉ A MALDI-TOF MS IDENTIFIKACE	49
5.3.1	Kmeny vláknitých hub vyvolávající orgánové nebo systémové mykózy	50
5.3.1.1	Výsledky.....	50
5.3.1.2	Hodnocení	50
5.3.2	Kmeny vláknitých hub vyvolávající povrchové mykózy	50
5.3.2.1	Výsledky.....	51
5.3.2.2	Hodnocení	51
5.4	SROVNÁNÍ METOD KLASICKÉ, MALDI-TOF MS A PCR IDENTIFIKACE	52
6.	DISKUZE	53

7.	ZÁVĚR	56
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	57
9.	SEZNAM ZDROJŮ LITERATURY	58
10.	PŘÍLOHY	63

Úvod

MALDI TOF hmotnostní spektrometrie se v laboratorní praxi již rutině využívá k identifikaci bakterií a kvasinek, tuto metodu lze využít i k identifikaci mykobakterií a vláknitých hub.

Náplní a cílem mé bakalářské práce je zavedení metodiky do rutinní praxe v laboratoři, srovnání této metody s výsledky získanými klasickou identifikací vláknitých hub a rovněž srovnání této metodiky s metodou sekvenace genomu vláknitých hub.

V úvodní teoretické části mé bakalářské práce se věnuji základním charakteristikám vláknitých hub, jejich základnímu rozdělení, taxonomii, stavbě buňky, životnímu cyklu a rozmnožování. Další náplní mé práce jsou metody kultivace a metody identifikace vláknitých mikromycet (klasická identifikace, metody průkazu mykotické DNA, princip MALDI-TOF MS a složení hmotnostního spektrometru).

V praktické části jsem se zaměřila na samotné zpracování kmenů vláknitých mikromycet, jejich extrakci a následné měření za použití MALDI-TOF hmotnostního spektrometru microflexTM series značky Bruker Daltonic. Dále potom na vyhodnocení výsledků měření hmotnostním spektrometrem a srovnání těchto výsledků s ostatními možnostmi identifikace.

1. Teoretická část

1.1 Obecná charakteristika hub

Jedná se o organizmy eukaryotní, které byly nejprve řazeny mezi rostliny, v současnosti vytvářejí vlastní říši houby neboli fungi. Většinou se jedná o saprofyty a parazity, protože nejsou schopné fotosyntézy neboť neobsahují chlorofyl. Vyvolávají infekce v závislosti na imunitním stavu organismu, tzn. v případě snížené obranyschopnosti organismu, mluvíme tak o oportunních patogenech. Dle morfologie rozeznáváme dvě, potažmo tři základní skupiny: kvasinky, vláknité houby a dimorfní houby. (Votava a kol., 2010)

1.2 Základní morfologické rozdělení hub

1.2.1 Kvasinky

Mikroorganismy většinou oválného nebo kulatého tvaru, rozmnožují se pučením. Některé druhy kvasinek jsou schopné vytvářet tzv. pseudomycelia, což jsou protáhlé kvasinkové buňky výrazně připomínající hyfy vláknité houby. Pseudomycelium umožňuje kvasinkám lepší průchod tkání a tudíž vyšší patogenitu. Na Sabouraudově agaru rostou většinou jako bílé nebo krémové kolonie různého vzhledu např. hladké, drsné, lesklé nebo matné atd. Nejčastějším patogenem ze skupiny kvasinek je rod *Candida* konkrétně druh *Candida albicans* (Larone, 1995).



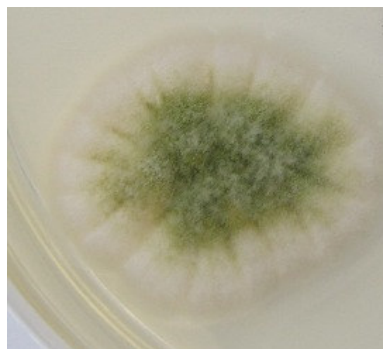
Obr. 1: Ilustrační obrázek izolace kvasinky *Candida albicans* (Ústav mikrobiologie FN Plzeň)

1.2.2 Vláknité houby

Tyto houby jsou na rozdíl od kvasinek tvořeny vlákny (hyfami). Hyfy se dělí na:

- vegetativní (tyto hyfy ukotvují houbu v substrátu, ve tkáni nebo v agaru)
- vzdušné (tyto hyfy jsou nositeli struktur odpovědných za rozmnožování).

Celý soubor hyf se nazývá mycelium (Votava a kol., 2003).



Obr. 2: Ilustrační obrázek kolonie vláknité houby

1.2.3 Dimorfní houby

Dimorfní houby jsou skupinou, která s ohledem na kultivační teplotu a podmínky roste, buď jako kvasinka (kultivace při teplotě 37°C) nebo jako vláknitá houba (kultivace při teplotě 25-30°C). Mezi dimorfní houby řadíme například druh *Histoplasma capsulatum* nebo *Blastomyces dermatitidis*. V případě výskytu těchto druhů se vždy jedná o jasněho patogena. V České republice se běžně nevyskytují, ale mohou být importované z ciziny (Larone, 1995). V rámci rutinního vyšetřování se kultivace těchto hub běžně neprovádí, prokazuje se antigen nebo se stanovuje titer protilátek serologicky.

1.3 Taxonomie hub

Uspořádání vláknitých hub do hierarchického systému je velmi komplikované. Vláknité houby jsou schopny měnit pohlavní (teleomorfa) a nepohlavní (anamorfa) stádia a velkým problémem při taxonomickém zařazení vláknitých mikromycet je, že anamorfní stádium je vzhledově naprosto odlišné od teleomorfního. Velmi často se

v taxonomii vyskytují dvě různá jména vláknitých hub mající odlišný vzhled, přitom se jedná o dvě stádia jedné vláknité mikromycety. U některých hub je k jednomu teleomorfnímu stádiu přiřazeno více anamorf, rovněž existují houby, u kterých pohlavní stádium (teleomorfa) zatím nebylo popsáno. To vše přispívá k faktu, že komplexní taxonomie hub stále ještě nebyla vytvořena a stále se vyvíjí – hlavně za přispění molekulárně genetických metod. (Votava, 2003) Následující přehled není kompletní s ohledem na velké množství skupin, rodů a druhů. Následující přehled dává představu orientační a pouze o rozdělení lékařsky významných mikromycet (Tab. 1) (De Hoog, 2000), (Votava, 2010).

Tab. 1: Přehled taxonomie klinicky významných vláknitých hub.

Říše	Oddělení	Třída	Řád	Rod
Eumycota (Pravé houby)	Chytridiomycota			
	Zygomycota (Spájkivé houby)	Mucorales		<i>Mucor</i> <i>Rizomucor</i> <i>Rizopus</i> <i>Absidia</i>
		Mortierellaceae		<i>Mortierella</i>
		Entomophthorales		<i>Basidiobolus</i> <i>Conidiobolus</i>
	Ascomycota (Vřeckovýtrusné houby)	Archiascomycetes		<i>Pneumocystis</i>
		Hemiascomycetes		<i>Candida</i> <i>Geotrichum</i>
		Euascomycetes	Onygenales	<i>Microsporum</i> <i>Trichophyton</i> <i>Epidermophyton</i> <i>Blastomyces</i> <i>Histoplasma</i> <i>Coccidioides</i>
			Eurotiales	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i>
	Basidiomycota (Stopkovýtrusné houby)			

1.4 Stavba buňky vláknitých mikromycet

Stavba eukaryotické buňky hub je odlišná od buněk živočišných a rostlinných. Rozdíl je například ve složení buněčné stěny. Živočišné buňky stěnu nemají, u rostlinných buněk je tvořena celulózą a houby mají ve stěně obsaženy hlavně polysacharidy (mannany, galaktomannany, glukany, chitin a chitosan). Mannan, galaktomannan a glukan jsou využívány především k laboratorní diagnostice, např. stanovení aspergillového galactomannanu metodou ELISA při diagnostice invazivní aspergilózy. Další odlišností, je přítomnost sterolů v cytoplasmatické membráně vláknitých hub, jejichž blokování se využívá například při antimykotické léčbě (Votava, 2010), (De Hoog, 2000).

1.5 Životní cyklus hub

Rozlišujeme dvě stádia životního cyklu: pohlavní (teleomorfní) a nepohlavní (anamorfní). Většina hub se může vyskytovat v obou formách, vždy časově odděleně v závislosti na podmínkách prostředí (Tab. 2).

Pohlavní rozmnožování je běžný způsob rozmnožování u většiny druhů vláknitých hub. Probíhá meiózou neboli redukčním dělením a vytvářejí se spory (výtrusy).

Při nepohlavním rozmnožování nedochází k tvorbě pohlavních buněk. Tento způsob probíhá mitózou a vytvářejí se konidie. Rozlišujeme několik způsobů uložení konidii např. konidie volně uložené na myceliu, umístěné na nosiči nebo uložené v pouzdře. Toto uložení konidií vytváří charakteristický obraz jednotlivých vláknitých hub a využívá se k identifikaci (Votava, 2010), (De Hoog, 2000).

Tab.2: Ukázka rozdílnosti názvosloví a existence pohlavního a nepohlavního stádia u některých druhů vláknitých hub.

Anamorfa	Teleomorfa
<i>Microsporum canis</i>	<i>Arthroderma otae</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Emericela nidulans</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Není popsána
Není popsána	<i>Mucor circnelloides</i>

1.6 Klinicky významné vláknité houby

Vláknité houby, které napadají člověka a jsou schopné vyvolat u něj onemocnění řadíme do skupiny lékařsky významných. Je nutné počítat s tím, že většina vláknitých mikromycet má ubikviterní výskyt a v přírodě se většinou vyskytují ve formě spór. Je na rozhodnutí lékaře posoudit dle klinických příznaků, zda kultivační nález vláknité houby je kontaminace ze zevního prostředí nebo se jedná o původce onemocnění (Larone, 1995). Vláknité houby mohou vyvolávat závažná onemocnění nebo závažné komplikace u imunokompromitovaných pacientů (hematologická nádorová onemocnění, infekce HIV, transplantace, autoimunitní choroby, dlouhodobě hospitalizovaní). Další možností nákazy je import závažných mykotických agens při pobytu v cizině (Votava, 2003).

Rozlišujeme čtyři základní skupiny klinicky významných mikromycet:

- Dermatofyta
- Hyfomycety (hyalinní formy)
- Hyfomycety (dematiace formy)
- Zygomycety

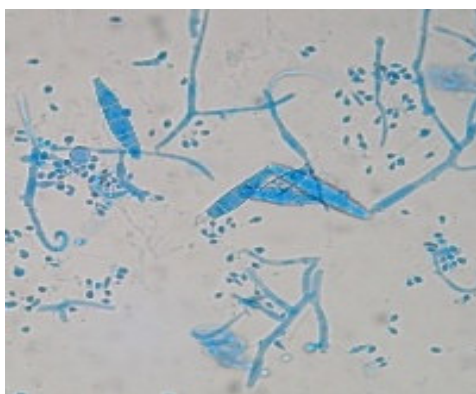
1.6.1 Dermatofyta

Tato skupina vláknitých hub se vyznačuje velmi dlouhou dobou kultivace, optimálně mezi 3 až 6 týdny. Dermatofyta jsou mikromycety, které rozkládají keratin a využívají ho ke svému růstu. Někdy mohou být označovány též jako keratofilní houby. Podle způsobu přenosu nákazy je můžeme rozdělit na:

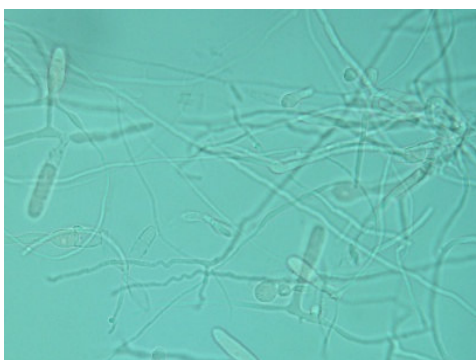
- Antropofilní přenos z člověka na člověka - např. *Trichophyton rubrum*
- Geofilní přenos z půdy na člověka - např. *Microsporum gypseum*
- Zoofilní přenos ze zvířat na člověka - např. *Microsporum canis* (pes, kočka)

Dermatofyta patří do skupiny vřeckovýtrusných hub a lze je rozdělit do tří anamorfních rodů: *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*

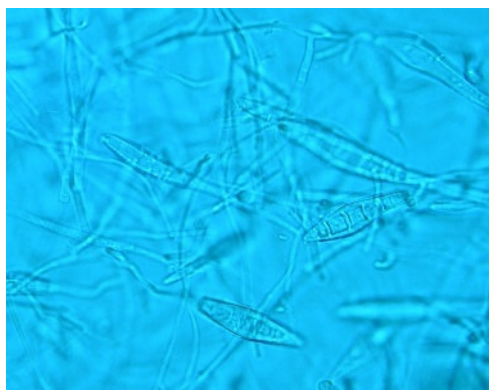
Jsou nejčastějšími patogeny povrchových mykóz (Hubka, 2012), (Larone, 1995).



Obr.3: Mikroskopický obraz *Trichophyton mentagrophytes* v laktofenolovém preparátu (Ústav mikrobiologie FN Plzeň)



Obr. 4: Mikroskopický obraz *Epidermophyton floccosum* v laktofenolovém preparátu (Ústav mikrobiologie FN Plzeň)

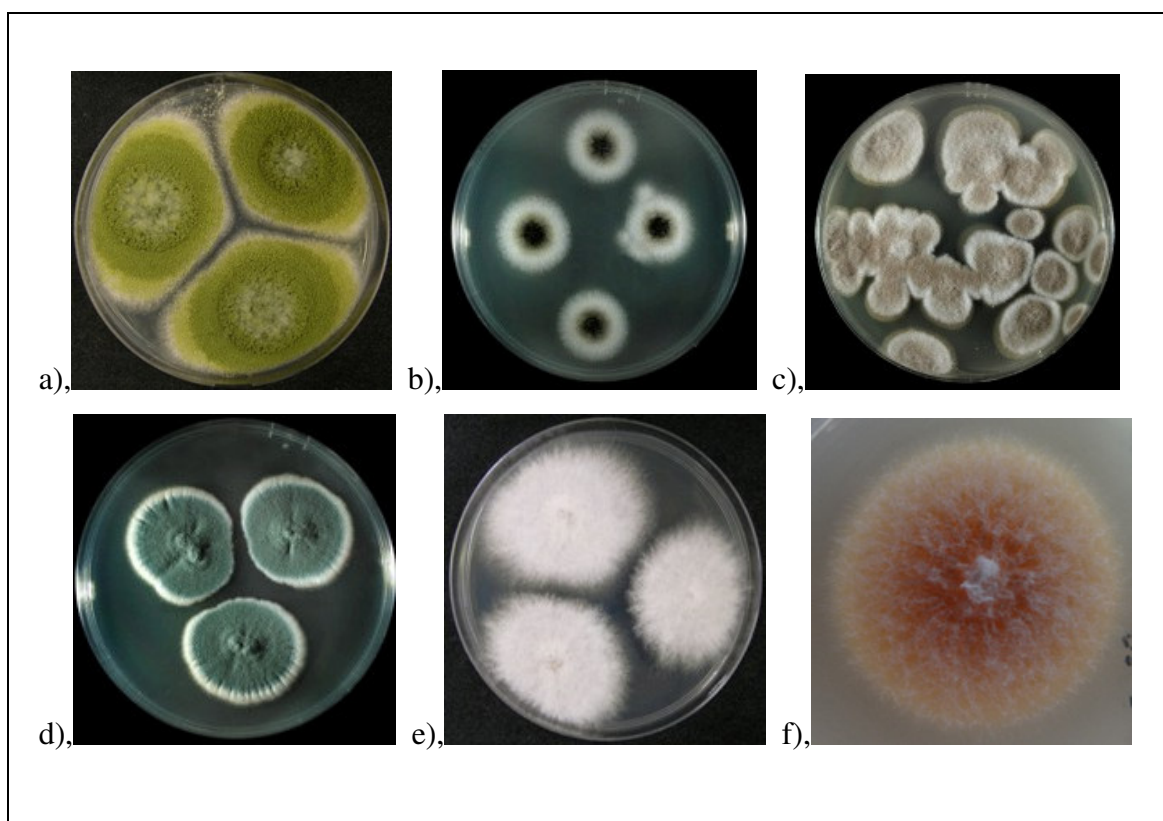


Obr. 5: Mikroskopický obraz *Microsporum canis* v laktofenolovém preparátu. (Ústav mikrobiologie FN Plzeň)

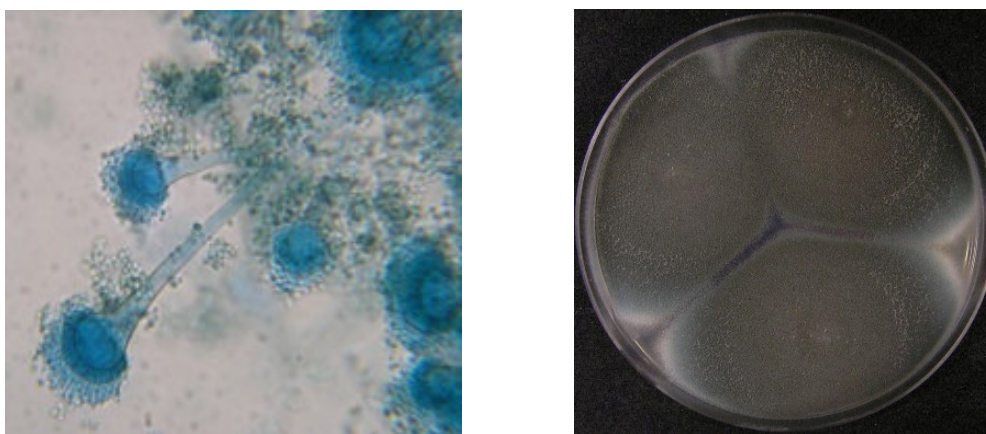
Ostatní druhy vláknitých hub ze skupin hyfomycet a zygomycet jsou zpravidla odpovědné za systémová a orgánová onemocnění, často u pacientů s imunodeficitem.

1.6.2 Hyfomycety (septované hyalinní formy)

Hyalinní hyfomycety jsou skupina vláknitých hub, mající septovaná vlákna. Povrch kolonie může být od bezbarvého až po různě zbarvený (Obr.6). Průměrná doba kultivace se pohybuje okolo 3 až 5 dnů. Většina hub z této skupiny je řazena mezi oportunní patogeny, ale například *Coccidioides immitis* zařazený též do této skupiny je jasným patogenem (Larone, 1995). Někteří zástupci této kategorie: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Scopulariopsis* (De Hoog, 2000). Nejdůležitějším a nejčastějším patogenem této skupiny je rod *Aspergillus*, potažmo jeho druh *Aspergillus fumigatus*. Některé druhy hyalinních hyfomycet jsou schopny produkovat mykotoxiny např. aflatoxin produkovaný druhem *Aspergillus flavus*, dále potom ochratoxin produkovaný druhem *Aspergillus ochraceus* (Votava, 2003).



Obr. 6: Makroskopický vzhled jednotlivých kolonií hyalinních hyfomycet. a), *Aspergillus flavus*. b), *Aspergillus niger*. c), *Aspergillus terreus*. d), *Penicillium species*. e), *Acremonium species* f), *Fusarium species*. (Ústav mikrobiologie FN Plzeň)



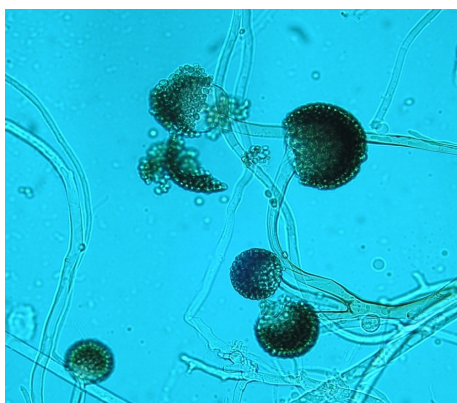
Obr. 7: Mikroskopický a makroskopický obraz *Aspergillus fumigatus*. (Ústav mikrobiologie FN Plzeň)

1.6.3 *Hyfomycety (pigmentované dematiace formy)*

Tato skupina vláknitých mikromycet roste v tmavě hnědých, zeleno-černých, nebo černých koloniích, díky pigmentu melaninu, který je obsažen v jejich buněčné stěně. Doba kultivace se pohybuje stejně jako u hyaliniích hyfomycet od 3 do 5 dnů. Někteří zástupci této kategorie jsou: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium* (Larone, 1995), (De Hoog a kol., 2000).

1.6.4 *Zygomycety*

Zygomycety jsou skupinou rychle rostoucích hub, vyznačující se většinou širšími, neseptovanými vlákny. Optimální doba kultivace je 1-2 dny, ale již po několika hodinách je patrný nárůst. Tvoří sporangia, což jsou váčky naplněné sporami a po jejich prasknutí dochází k uvolnění spor do okolí (Obr. 8). Někteří zástupci z této kategorie jsou: *Mucor*, *Absidia*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* (Larone, 1995), (De Hoog a kol., 2000).



Obr. 8: Mikroskopický vzhled zygomycety. (Ústav mikrobiologie FN Plzeň)

1.7 Onemocnění vyvolaná vláknitými houbami

V lidském organismu mohou vláknité mikromycety vyvolávat jednak infekce, rovněž mohou působit jako alergen (např. astma, senná rýma) a produkcí toxinů mohou vyvolat otravy (např. kontaminace potravin aflatoxiny) (Votava a kol, 2003).

Infekční onemocnění (mykózy) vyvolané vláknitými mikromycetami můžeme dále rozdělit na povrchové, orgánové a systémové. Toto rozdělení je velmi důležité pro odběr materiálu, zpracování, kultivaci a posléze i identifikaci izolátu vláknité mikromycety.

1.7.1 Povrchové mykózy

Onemocnění postihuje hlavně kůži, nehty ale i vousy a vlasy. Hlavními patogeny jsou v těchto případech keratofilní mikromycety (*Epidermophyton*, *Microsporum* a *Trichophyton*), vyvolávající na kůži tineu a na nehtech onychomykózu. Ložiska se obvykle vytvářejí na vlhkých, špatně větratelných místech lidského těla, např. mezi prsty a nehty dolních končetin, podpaží, třísla a u žen pod prsy. Nález dermatofyta u povrchových mykóz se rovná určení původce infekce. Při nálezu hyfomycet a zygomycet se velmi často jedná o kontaminaci z prostředí (Fragner, 1990). Nejčastěji se vyskytujícím a nejčastěji izolovaným patogenem povrchových mykóz je *Trichophyton rubrum* (Hubka a Mallátová, 2012).

1.7.2 Orgánové mykózy

Mykotické infekce oportunního charakteru, které často postihují plíce, ledviny, srdce, centrální nervovou soustavu a gastrointestinální trakt. Patogenem jsou často kvasinky, ale může jím být stejně tak i vláknitá houba. Například rhinocerebrální a plicní mykózy, nebo osidlování popálenin způsobené zygomycetami. Dalším typickým příkladem je druh *Aspergillus fumigatus*, vyvolávající plicní aspergilózu a různě lokalizované abscesy. *Aspergillus flavus* často způsobuje záněty zevního zvukovodu atd. (Votava a kol., 2003).

1.7.3 Systémové mykózy

Jsou závažná septická onemocnění, vznikající rozsevem orgánové mykózy a tvorbou ložisek v dalších orgánech a tkáních lidského těla (Votava a kol., 2003).

1.8 Odběr materiálu pro mykologické vyšetření

Materiál odebraný pro mykologické vyšetření se liší podle předpokládané lokalizace. Jiný druh materiálu a způsob odběru se provádí u podezření na povrchové mykózy i spektrum očekávaných nálezů je odlišné od případů mykóz orgánových nebo systémových.

1.8.1 Odběr materiálu při podezření na povrchové mykózy

Materiál zasílaný do mykologické laboratoře při podezření na povrchovou mykózu jsou nehty, chlupy, vlasy, vousy a samozřejmě kožní šupiny se specifikací umístění ložiska. Při odběru tohoto materiálu je potřeba materiál získat z rozhraní mezi zdravou a postiženou tkání, neboť mykotická infekce se šíří paprskovitě od místa vzniku. Ložisko má většinou kruhový tvar a právě na rozhraní mezi zdravou a postiženou tkání je nejvyšší pravděpodobnost pozitivního kultivačního nálezu. Správně provedený odběr tudíž velmi výrazně ovlivňuje výsledek vyšetření. Seškrab se provádí do sterilní nádoby (Petriho miska, zkumavka) po předchozí dekontaminaci ložiska

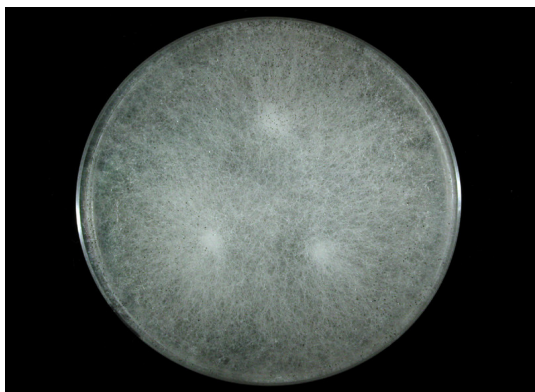
70% etanolem, tím dochází k odstranění případných kontaminantů (Skořepová, 2008) (Fragner, 1990).

1.8.2 Odběr materiálu při podezření na systémové a orgánové mykózy

Odběr se provádí obdobně, jako v případě odběru materiálu pro bakteriologické vyšetření. Stěry nebo tekutý materiál odebraný do sterilní nádoby za aseptických podmínek. Běžně zasílaným materiálem jsou: stěry z ran, sliznic (krk, nos, dutina ústní, jazyk, stěr z rektu), sputum, broncho-alveolární laváž, punktáty, mozkomíšní mok, moč atd. (Votava a kol., 2010).

1.9 Zpracování a kultivace materiálu

Zpracování a následná kultivace v laboratoři je opět odlišná, neboť kultivační nároky jednotlivých skupin vláknitých hub jsou výrazně rozdílné. Hlavními odlišnostmi jsou např. kultivační média, teplota a délka kultivace. Na ilustračním obrázku je vidět srovnání dvou kmenů vláknitých hub – Zygomycety (Obr. 9), která je patogenem v případech orgánových mykóz a dermatofytické houby (Obr.10), která je původcem povrchových mykóz.



Obr. 9: Nárůst zygomycety (36 hodin) při teplotě 37°C (Ústav mikrobiologie FN Plzeň)



Obr.10: Nárůst dermatofyta (3 týdny) při teplotě 27°C (Ústav mikrobiologie FNPlzeň)

1.9.1 Kultivace materiálu při podezření na povrchové mykózy

1.9.1.1 Kultivace

Při kultivaci kožních šupin, nehtů, vlasů atd. je materiál zpracován na Sabouraudův (SAB) agar šikmo vylitý ve zkumavce. Použití šikmo vylitého agaru ve zkumavce zabraňuje, s ohledem na delší dobu kultivace, rychlému vyschnutí agaru. Materiál nanášíme vpichem do agaru. Kromě obyčejného čistého SAB agaru je možno používat SAB agar s přidaným antibiotikem, které potlačuje růst gramnegativních tyčinek (např. chloramphenicol). Další možností je využití SAB agaru s přidaným actidionem, který potlačuje růst hyfomycet, většinou představujících kontaminaci. Zpracování se pro lepší záchyt provádí do třech zkumavek a takto naočkované zkumavky se inkubují v termostatu při teplotě 27°C po dobu 3 až 4 týdnů (Skořepová, 2008) (Fragner a Hejtmánek, 1990).

1.9.1.2 Mikroskopie

Souběžně s kultivací se provádí mikroskopie z nativního preparátu – tzv. Louhový preparát. Na podložní sklíčko je dána 1 kapka 20% KOH s přidaným barvivem MykoInk (náhrada Parkerova inkoustu, který se již nevyrábí). Očkovací jehlou je přidán vyšetřovaný materiál a toto je překryto krycím sklíčkem. Preparát se nechává ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Mikroskopický preparát je možno hodnotit nejdříve po 40 min.

Hodnocení kultivace se provádí po 3 týdnech porovnáním mikroskopického a kultivačního nálezu. Negativní mikroskopie a negativní kultivace znamená, že výsledek je ukončen jako negativní. Pozitivní mikroskopie a negativní kultivační nález prodlužuje kultivaci o 1-2 týdny. Důvodem může být předchozí antimykotická léčba. Pozitivní mikroskopie i kultivace znamená pozitivní nález. Vykultivovaná vláknitá houba je izolována a následně identifikována (Votava a kol., 2010) (Fragner a Hejtmánek, 1990).

1.9.2 Kultivace materiálu při podezření na systémové mykózy

1.9.2.1 Kultivace

Při kultivaci se vzorky zpracovávají naočkováním na Sabouraudův agar, eventuálně na chromogenní půdu (pro barevné rozlišení některých druhů kvasinek). Při podezření na orgánové mykózy je používán agar vylitý do klasické Petriho misky, neboť doba kultivace je kratší. Materiál se nanáší na agar a nerozočkovává se. Moč se zpracovává semikvantitativně sterilní jednorázovou kličkou, kalibrovanou na 1 μ l. Materiál se inkubuje v termostatu při 35°C, 2 – 3 dny.

Důležité materiály jako je mozkomíšní mok, hnis z ran, apod. jsou zpracovávány na pevné kultivační půdy a do tekuté pomnožovací půdy (SAB bujon). Takto naočkovaný materiál se inkubuje v termostatu při 35°C po dobu minimálně 48 hodin, ale dobu kultivace je možno podle potřeby nebo očekávání prodloužit.

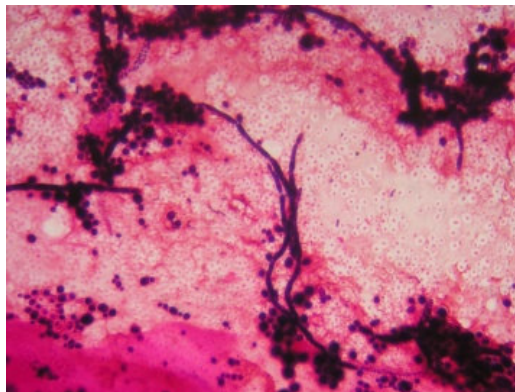
Při zpracování tekutých materiálů, jako je: sputum, bronchoalveolární laváž, výpotek, mozkomíšní mok, atd., se kromě kultivace připravuje též preparát barvený dle Grama. Tento preparát slouží k přehledu o mikroskopickém složení vyšetřovaného materiálu (Votava a kol., 2010).

1.9.2.2 Mikroskopie

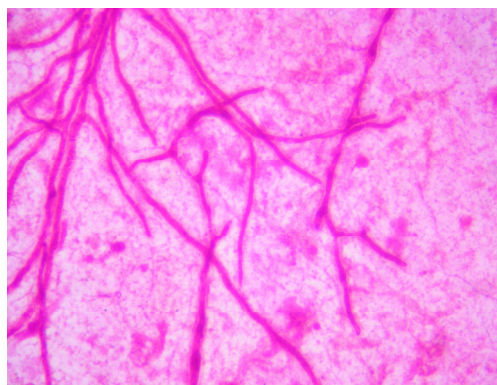
1.9.2.2.1 Barvení dle Grama

Základní mikrobiologické barvení, prováděné z tekutých materiálů, např. ze sekretu dýchacích cest, punktátu, mozkomíšního moku atd. Toto barvení slouží k základní orientaci. Lze hodnotit přítomnost krevních buněk (erytrocyty, leukocyty), přítomnost epitelu a rovněž lze hodnotit přítomnost mikroorganismů (bakterií, kvasinek a vláknitých hub) (Votava, 2010). V první fázi se fixovaný preparát barví krystalovou violetí, přidá se Lugolův roztok a vzniká komplex barviva a jódu. Následuje fáze odbarvení acetonem. Mikroorganismy, které si komplex barviva s jodem udrží jsou

grampozitivní, ty které ne jsou gramnegativní. Poslední fází je obarvení karbolfuchsinem, čímž se dobarví gramnegativní mikroorganismy (Votava, 2001).



Obr. 11: Mikroskopický vzhled kvasinky i s pseudomyceliem po obarvení Gramem (Ústav mikrobiologie FN Plzeň)



Obr. 12: Mikroskopický vzhled kvasinky i s pseudomyceliem po obarvení Gramem (Ústav mikrobiologie FN Plzeň)

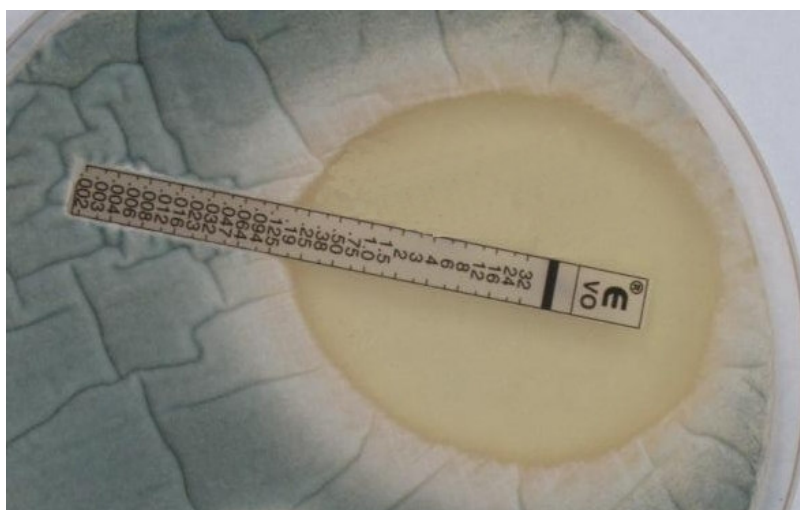
1.9.2.2 Fluorescenční preparát

Tato technika využívá specifickou vazbu fluorescenčního barviva na stěnu vláknité houby. Preparát je hodnocen ve fluorescenčním mikroskopu při vlnové délce 420 nm a takto obarvené vláknité houby zeleně fluoreskují. Nejčastěji využívaným fluorescenčním barvivem je Rylux (Synthesia Pardubice) (Votava, 2010).

1.10 Stanovení citlivosti na antimykotika

Stanovení citlivosti na antimykotika (azoly, echinokandiny, amfotericin B) se v běžné rutinní mykologické laboratoři provádí pouze u pacientů se závažnými diagnózami např. pacienti po transplantacích orgánů atd.. Testování citlivosti u patogenů povrchových mykóz se neprovádí (s ohledem na 3 týdenní kultivaci), pacientovi jsou podávána lokální antimykotika např. terbinafine (Lamisil), clotrimazol (Canesten) atd. (Votava, 2001). K testování citlivosti na antimykotika je možné používat metody kvalitativní, to je např. diskový difúzní test, avšak v dnešní době se většinou využívají metody kvantitativní. Příklady kvantitativních metod (stanovení minimální inhibiční koncentrace MIC) jsou mikrodiluční metoda nebo Etest. Typickým a hojně využívaným komerčně vyrobeným testem MIC je Sensititre Yeast one. (Mallátová, 2011).

Hodnocení výsledků stanovení citlivosti kvasinek na antimykotika se provádí porovnáním s interpretačními kritérii CLSI (Ústav pro klinické a laboratorní standardy) a EUCAST (Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti). Stanovení citlivosti v případě vláknitých hub lze provést, nejčastěji se využívá Etest (Obr. 13), ale bohužel interpretační kritéria nejsou dána standardem a takto stanovené citlivosti jsou pouze orientační (Mallátová, 2011).



Obr. 13: Výsledek testování citlivosti kmene *Aspergillus fumigatu* na voriconazol pomocí Etestu

2. Metody identifikace vláknitých hub

Existuje několik způsobů identifikace vláknitých mikromycet. Tyto metody se liší hlavně přesností, dobou trvání, cenou a náročností na technické vybavení. Nejstarším a nejběžnějším způsobem identifikace je v mykologických laboratořích stále ještě klasický způsob dourčení. Další možností určení kmene vláknité houby je MALDI-TOF MS a nebo metoda sekvenace genomu vláknité houby. Obě posledně jmenované jsou poměrně nové metody, které výrazně zrychlují a zpřesňují identifikaci.

Při manipulaci s kmeny vláknitých hub je nezbytné pracovat v laminárním boxu. Jednak z důvodu zabránění kontaminace vzorku vzdušnými plísněmi. Druhým důvodem je zábrana úniku spor ze vzorku do prostředí, tudíž omezení možnosti vdechnutí spor (Otčenášek a kol., 1990).

2.1 Klasická metoda identifikace vláknitých hub

Klasická metoda identifikace je založena na vyhodnocení mikroskopického a makroskopického vzhledu vláknité houby. Jedná se o metodu levnou a nenáročnou, nicméně poměrně zdlouhavou. Kultivační fázi identifikace je potřeba prodloužit dokud se nevytvoří charakteristické identifikační znaky. Doba této fáze může být, s ohledem na druh velmi odlišná. V případě zygomycet 1-3 dny, hyfomycety 3–7 dní a dermatofyta zhruba 3 týdny (eventuelně i 6 týdnů např. u *Trichophyton violaceum*) (Skořepová, 2008) (Votava a kol., 2010). Hodnocení mikroskopického obrazu se provádí pomocí laktofenolového preparátu a mikrokultivace. Makroskopický vzhled se popisuje z izolace vláknité houby.

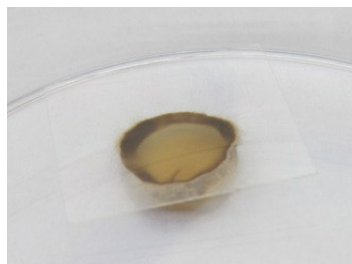
2.1.1 Laktofenolový preparát

Slouží k mikroskopickému ozřejmění uspořádání struktur vláknité houby. Na podložní sklíčko je kápnuta 1 kapka roztoku laktofenolu a očkovací jehlou je přidána část narostlé vláknité houby. Toto je překryto krycím sklíčkem a několikrát protaženo nad plamenem (odstranění vzduchových bublinek). Preparát je prohlížen pod

mikroskopem. Pomocí laktofenolového preparátu lze ozřejmit i narostlou mikrokultivaci. Přenesením krycího sklíčka z bločku mikrokultivace do roztoku laktofenolu na podložním sklíčku (Fragner a Hejtmánek, 1990) (Otčenášek a kol., 1990).

2.1.2 *Mikrokultivace (mikrokultura)*

Při přípravě mikroskopických preparátů může dojít k poškození charakteristických identifikačních znaků a tento problém odstraňují mikrokultivace (Otčenášek, 1990). Ze SAB agaru jsou vyříznuty bločky. Sterilní jehlou jsou bločky přeneseny do sterilní Petriho misky. Očkovací jehlou je nabrána část narostlé vláknité houby a naočkován bloček z boku. Každý bloček je překryt krycím sklíčkem (Skořepová, 2008).



Obr. 14: Ilustrační obrázek narostlé mikrokultivace vláknité houby

2.1.3 *Izolace vláknité houby*

Očkovací jehlou je nabrána část vyrostlé vláknité houby a třemi vpichy je naočkován SAB agar nebo na Czapkova půda (Skořepová, 2008).

Izolace a mikrokultura je uložena do vlhké komůrky, uzavřena a kultivována v termostatu při teplotě 27°C. Doba kultivace je různá, musí se inkubovat do té doby než, vláknitá houba vytvoří charakteristické identifikační znaky. Pokud vláknitá houba konidie nevytváří, je možné jejich produkci podpořit kultivací na výživově chudých mediích, např. kukuřičný, bramborový nebo rýžový agar (Otčenášek, 1990).



Obr.15: Ilustrační obrázek narostlé izolace vláknité houby

2.1.4 Hodnocení klasické identifikace

Hodnocení provádí zkušený mykolog srovnáním narostlé mikrokultivace, kde se hodnotí hlavně uspořádání struktur (postavení konidií na konidioforu, přítomnost nebo nepřítomnost makrokonidií atd.) a izolace (hodnotí se povrch, okraje, spodina, pigmentace a struktura vláknité houby). To vše se porovnává s atlasem vláknitých hub (Fragner a Hejtmánek, 1990), (Votava a kol., 2010).

2.2 Průkaz mykotické DNA (identifikace 18S rDNA)

Tato metoda je využívána mikrobiologickými laboratořemi v případech:

- kdy není možné vykultivovat původce infekčního agens z klinického materiálu,
- kdy nelze určit původce infekčního agens běžně dostupnými identifikačními metodami.

Metoda 18S rDNA umožňuje identifikaci a klasifikaci eukaryot (kvasinky a plísňe), oproti tomu metoda 16S rDNA slouží k identifikaci prokaryot (bakterie). Průkaz mykotické DNA se skládá z několika postupů, které na sebe kontinuálně navazují:

- namnožení genu 18S rDNA pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce),
- kontrola PCR reakce pomocí gelové elektroforézy,
- přečištění PCR produktu,
- vlastní sekvenace tohoto produktu (Sangerova sekvenace),

2.2.1 Namnožení genu 18S rDNA pomocí polymerázové řetězové reakce

Reakce začíná smícháním vyizolované DNA ze vzorku s PCR mixem. Tento mix dodávaný do reakce obsahuje deoxyribonukleozidtrifosfáty, hořčnaté ionty, primery, templátovou DNA a DNA polymerázu (Taq polymeráza). PCR reakce se skládá z cyklů (minimálně 30) a každý cyklus má tři stále se opakující části (denaturace, nasedání primerů, polymerace). Opakováním cyklů dochází k exponenciálnímu nárůstu množství produktu (mykotická DNA).

Fáze denaturace – vlivem vysoké teploty 92-95°C po dobu 1 minuty dochází k porušení dvouvláknové struktury DNA a k jejímu rozštěpení na jednovláknové.

Fáze nasedání primerů (annealing) – v této části cyklu nasedají syntetické primery (součást dodaného mixu) na odpovídající části genu (v našem případě 18S rDNA). Druhá fáze cyklu trvá cca. 30 vteřin a teplota se nastavuje tak, aby byla ideálně o 5°C nižší než je teplota tání použitých primerů.

Fáze polymerace (extension) – třetí fáze cyklu, ve které dochází ke komplectaci vlákna DNA vlivem DNA polymerázy. Doba trvání této fáze je přibližně 1minutu a probíhá při teplotě 72°C (Snustad, 2009).

2.2.2 Vyhodnocení PCR reakce

Kontrola úspěšnosti proběhnuté reakce se provádí gelovou elektroforézou. Používá se 1,5% agarozový gel, vzorky se nanesou do jamek. Molekuly DNA migrují v prostředí pufru, ve stejnosměrném proudu (100V). Elektroforéza je velice účinná separační metoda, pracující na principu rozdílného pohybu molekul ve stejnosměrném elektrickém poli od kladné k záporné elektrodě. Pohyblivost molekul v gelu je dána jejich velikostí a nábojem. Po proběhnutí elektroforézy je zapotřebí molekuly DNA v gelu ozřejmit. Toto se provádí obarvením etidium bromidem (naváže se na DNA a v UV oblasti fluoreskuje) (Snustad, 2009). K čištění produktů PCR z gelu se většinou využívá komerčních souprav vytvořených pro tento účel.

2.2.3 Sekvenace

Nejčastěji využívanou technikou je sekvence dle Sangera. Tato reakce využívá podobný princip jako PCR. S tím rozdílem, že kromě deoxyribonukleozidtrifosfátů (dNTP) jsou v reakci přítomné i značené dideoxyribonukleozidtrifosfáty (ddNTP) v poměru 100:1. Během polymerační fáze se do prodlužování řetězce zapojují dNTP. Řetězec se prodlužuje až do té doby než se naváže ddNTP, který nemá volnou OH skupinu pro navázání dalšího dNTP (syntetizovaný řetězec navázáním ddNTP končí). Dochází k tvorbě různě dlouhých fragmentů DNA, ty jsou v dnešní době rozdělčovány a vyhodnocovány automatickými sekvenátory. Principem sekvenátoru je spojení kapilární elektroforézy (rozdělí fragmenty dle velikosti) a detekce fluorescence jednotlivých ddNTP. Výsledkem je nukleotidová sekvence, která je následně vložena do online databáze a porovnána (Snustad, 2009).

Online databáze sloužící k porovnání získané sekvence je dostupná na adrese: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (Poslední přístup: 27.4.2014)

2.3 MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

2.3.1 Obecná charakteristika

Hmotnostní spektrometrie MALDI je metoda stanovující hmotnosti molekul a atomů převedením na ionty v prostředí vakua. Původně byla tato metoda vyvinuta pro analýzu peptidů a proteinů, nicméně v dnešní době je použití hmotnostní spektrometrie podstatně širší, využívá se ke stanovení nukleových kyselin, nízkomolekulárních, vysokomolekulárních, anorganických či organických látek (Norková a kol., 2013).

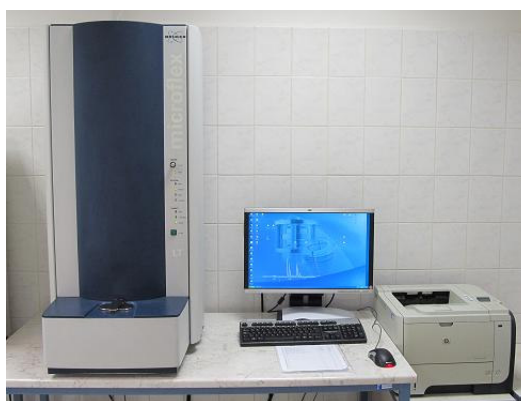
2.3.2 Historie MALDI-TOF MS

Hmotnostní spektrometrie byla využívána od 50 let 20. století hlavně chemickými obory. První charakterizaci bakteriálních druhů pomocí hmotnostní spektrometrie provedli Anhalt a Fenselau v roce 1975 (Anhalt a Fenselau, 1975). V 80. letech 20. století přesněji v roce 1985 byl poprvé popsán termín matrix assisted laser

desorption/ionization Franzem Hillenkampem a Michaellem Karasem (Karas a kol., 1987). Za vývoj měkké ionizační techniky MALDI (Tanaka a kol., 1988) pro analýzu biologických makromolekul pomocí hmotnostní spektrometrie získal v roce 2002 Nobelovu cenu za chemii japonský vědec Koichi Tanaka (Santos a kol., 2009), (Croxato a kol., 2012). Dalším zlomovým okamžikem byl rok 1996, kdy bylo získáno specifické molekulární spektrum MALDI-TOF MS analýzou celé bakteriální buňky, bez předchozích úprav (Holland a kol., 1996).

2.3.3 *Princip MALDI TOF MS*

Metoda hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem využívá měkké ionizace a rozdělení nabitých částic podle jejich molekulových hmotností v elektrickém a magnetickém poli. Vzorek je ionizován laserem a je důležité zajistit rovnoměrný přenos energie na vzorek, tak aby nedošlo k tepelnému rozkladu vzorku. Rozklad by nastal v případě přímé ionizace laserem. Látka (matrice) přidávaná ke vzorku zabraňuje rozpadu analyzované látky. Důležitým faktorem je skutečnost, že matrici je ke vzorku přidávána v nadbytku a existuje několik způsobů vrstvení vzorku a matrice na terčík. (www.bruker.com/maldibiotyper.com)



Obr. 16: MALDI-TOF hmotnostní spektrometr microflex™ series značky Bruker Daltonics.

Základní princip metody je: směs matrice a vzorku je zasažena nanosekundovým pulzem laseru → absorpce energie pulzu matricí → rozklad matrice (převedení matrice do plynného stavu) ionizuje molekuly vzorku, → ionty analyzované látky jsou při prostupu silným elektrickým polem (25–30 kV) urychlovány → vstupují do vakua v trubici detektoru letu, kde je jejich rychlost úměrná hmotnosti a náboji. → detektor (analyzátor doby letu, TOF) měří dobu letu částice a následně vypočte rychlost částice jako poměr molekulové hmotnosti a náboje částice (Cain a kol., 1994).

2.3.4 *Matrice*

Matrice představuje velmi důležitou část celé analýzy. Vhodný výběr zabraňuje nežádoucímu rozpadu analytu, tím, že rovnoměrně přenáší energii laseru na vzorek, ten je ionizován, tzn. převeden do plynné fáze.

Nejčastěji používanými matricemi jsou deriváty kyselin skořicové a benzoové v roztoku (slabé organické kyseliny, jejichž struktura obsahuje aromatické jádro). Roztok matrice je tvořen derivátem aromatické kyseliny, vodou, acetonitrilem, a kyselinami mravenčí a trifluoroctovou. Posledně jmenované kyseliny jsou ve směsi k tvorbě kyselějšího prostředí. (Williams a kol., 2003)

Přehled nejčastěji používaných matric:

- kyselina 2,5 – dihydroxybenzoová kyselina (DBH),
- kyselina 3,5-dimetoxy-4-hydroxyskořicová (SA),
- kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA),
- kyselina 4-hydroxy-3-metoxyskořicová (FerA),
- kyselina 2-(4-hydroxyfenylazo)benzoová (HABA)

(Croxato a kol., 2012).

Základní požadavky na matrici plynou z její funkce:

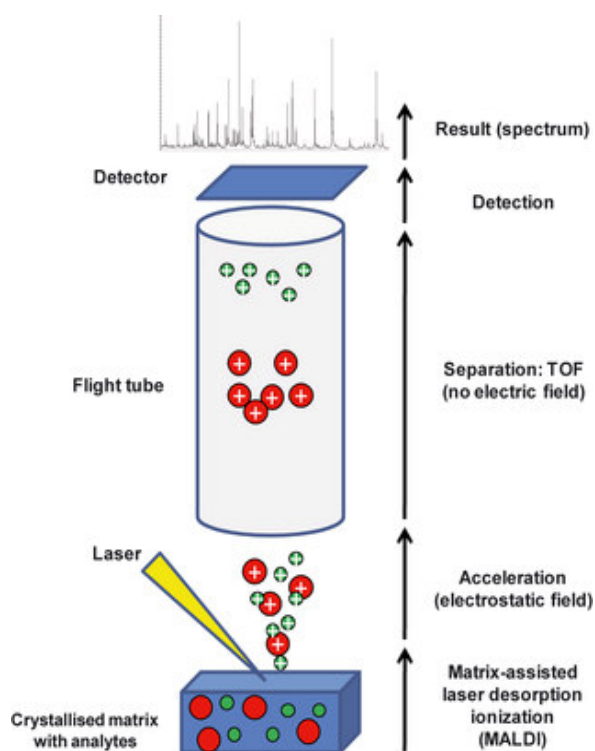
- přilnavost matrice ke stanovovanému analytu,

- krystalizace matrice a analytu za vzniku homogenního filmu, přičemž je nežádoucí, aby matrice ovlivňovala stanovovaný analyt,
- absorpce vlnové délky paprsku laseru,
- rozpouštědlo matrice by mělo být kompatibilní s rozpouštědlem vzorku

(Williams a kol., 2003).

2.3.5 Ionizace

Hlavním principem ionizace za použití matrice (Obr. 17) je, přenos energie z laserového paprsku na matrici, dojde k ionizaci matrice, ze které se uvolní proton. Takto vzniklý proton se přenesse z molekuly matrice na molekulu analyzovaného vzorku a vyvolá jeho ionizaci. (Croxato a kol., 2012)



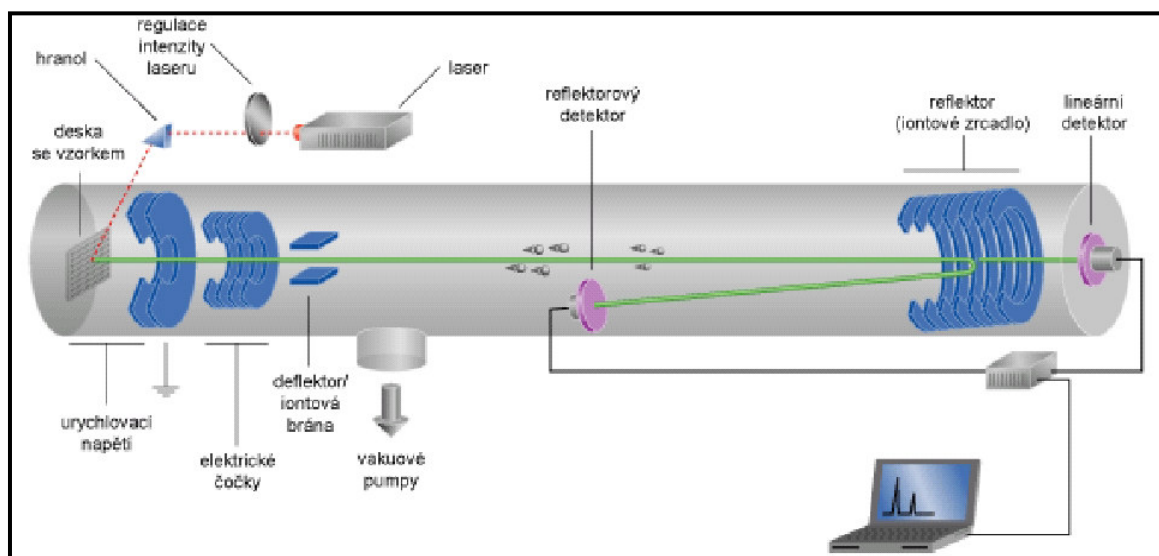
Obr. 17: Schematické znázornění ionizace a pohybu iontů MALDI TOF hmotnostním spektrometrem (Croxato a kol., 2012).

Ionizace analyzovaného vzorku za přítomnosti matrice je nejčastěji využívanou technikou pro identifikaci mikroorganismů, nicméně možností jak vzorek ionizovat je více:

- desorpce plazmou (DP),
- rychlé bombardování atomy (FAB),
- chemická ionizace (CI),
- electrospray (ESI),
- desorpce laserem (LD),
- desorpce a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI)

(Croxato a kol., 2012).

2.3.6 MALDI TOF MS schematické zobrazení přístroje



Obr. 18: Schéma přístroje MALDI TOF MS převzato z

http://www.ekomonitor.eu/sites/default/files/soubory/Inovativni/2010/2010_stursa_ft.pdf

(Poslední přístup: 27.4.2014)

MALDI-TOF hmotnostní spektrometr obsahuje ve své podstatě 3 základní složky. První složkou je zdroj iontů a ionizace – převedení molekul do plynného stavu. Druhou složkou je samotný hmotnostní spektrometr, jehož funkcí je separace iontů podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Poslední částí je systém zpracovávající data,

který je schopen zachycené spektrum porovnat s databází charakteristických vzorů a přiřadit, na základě shody, odpovídající název testovaného kmene. (Croxato a kol., 2012) (www.bruker.com/maldibiotyper)

2.3.7 Součásti hmotnostního spektrometru

Důležité součásti hmotnostního spektrometru jsou: systém vakua, laserový zdroj, reflektor, detektor, analyzátor TOF, digitizér a terčik. (www.bruker.com/maldibiotyper)

2.3.7.1 Systém vakua hmotnostního spektrofotometru

Tento systém je tvořen ze dvou částí, kdy v jedné části je nízké vakuum (oblast tlaku 2 mbar) a v druhé části vysoké vakuum (oblast tlaku 2×10^{-6} mbar). T- rozdělovač následně spojuje vakuovou komoru a turbomolekulární pumpu. Tato pumpa je napojena na sektor vysokého vakua, který obsahuje iontový zdroj a letovou trubici. Iontový zdroj je složen ze tří součástí a to, x-y fáze (pohybuje terčikem v x,y ose), vakuový zámek (přemisťuje terčik do oblasti vysokého vakua) a poslední složkou je pozitivně nebo negativně nabitý terčik a druhá paměťová deska.

V okamžiku, kdy laserový zdroj vyšle proud částic na směs vzorku a matrice, dochází k urychlování iontů a k jejich zaostření systémem čoček ještě před opuštěním iontového zdroje. (microflexTM uživatelský manuál Bruker Daltonics GmbH, 2008)

2.3.7.2 Systém laseru hmotnostního spektrometru

Tento systém se skládá se z několika částí. Nejdůležitější částí je pulzní UV laser (dusíkový laser s vlnovou délkou 337 nm), atenuátor (nastavuje laser), hranol a systém čoček (zaměření paprsku na terčik) (microflexTM uživatelský manuál Bruker Daltonics GmbH, 2008).

2.3.7.3 Reflektor (bezmřížkový reflektor s iontovými čočkami)

Tato součást zařízení se nachází na konci letové trubice a pracuje jako tzv. iontové zrcadlo, usměrňuje ionty na detektor. Nejdůležitější funkcí reflektoru je

kompenzace letových časů iontů s odlišnou kinetickou energií (microflex™ uživatelský manuál Bruker Daltonics GmbH, 2008).

2.3.7.4 Detektor (dva MPC detektory zapojené v sérii)

Slouží k převodu iontů na elektrický proud, který je následně převeden do digitální podoby do počítače. Pro hmotnostní spektrometr s TOF analyzátozem se používá - Mikrochannel plate detektor (MCP), který obsahuje miliony kanálků pokryté polovodičem, přičemž každý kanálek působí jako násobič elektrického proudu (microflex™ uživatelský manuál Bruker Daltonics GmbH, 2008).

2.3.7.5 Průletový analyzátor TOF (analyzátor doby letu)

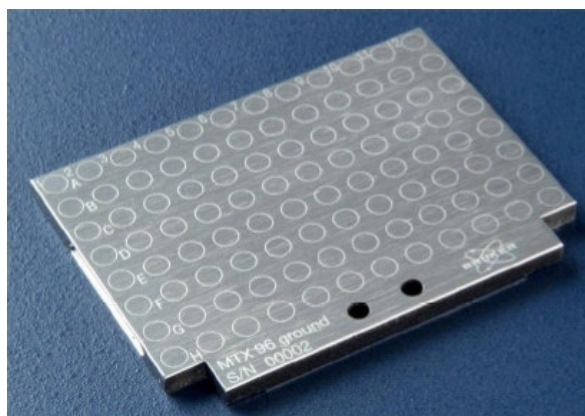
Analyzátor doby letu udává čas, za který se ionty dostanou na detektor. Existuje několik možností měření průletovým analyzátozem TOF a to: lineární, reflektorový a nebo PDS mód (microflex™ uživatelský manuál Bruker Daltonics GmbH, 2008).

2.3.7.6 Digitizér

Další složkou hmotnostního spektrometru je digitizér a slouží k záznamu analogových signálů a k jejich převodu na digitální záznam (microflex™ uživatelský manuál Bruker Daltonics GmbH, 2008).

2.3.7.7 MSP terčík

Tyto terčíky mohou být vyrobeny jednak z nerezové oceli, ale též z hliníku. Vždy se musí se jednat o materiál netečný vůči matici a vůči rozpouštědlům využívaným k přípravě vzorků. Pro snadnou orientaci jsou pozice terčíku označeny, řady jsou značené písmeny a sloupce číslly (Obr. 19) (microflex™ uživatelský manuál Bruker Daltonics GmbH, 2008).



Obr. 19: Terčák Micro SCOUT (96 pozic) pro stanovení pomocí MALDI TOF MS (microflex™ uživatelský manuál Bruker Daltonics GmbH, 2008).

2.3.8 Identifikace neznámého vzorku a určení skóre vzorku

Analytický program (MALDI Biotyper) v prvním kroku převádí naměřená hrubá spektra na seznam píků a následně tento seznam srovná se souborem předloh referenční databáze. Jak již bylo řečeno, každý mikroorganismus při analýze hmotnostním spektrometrem, uvolní ze své buněčné stěny určité spektrum vysokomolekulárních látek (např. proteiny, glykoproteiny, polysacharidy), které jsou pro svoji druhovou specifitu označovány jako molekulární „otisky prstů“ (molecular fingerprints). Toto detekované spektrum je následně porovnáváno s charakteristickými spektry, uloženými v referenční databázi (Carbonelle a kol., 2007).

Identifikační skóre vzorku v podstatě udává těsnost shody mezi referenčním spektrem a spektrem zkoumaného kmene. Hodnota skóre je tudíž indikátorem, který slouží k rychlému posouzení kvality proběhnuté identifikace. Určuje míru pravděpodobnosti správného určení vyšetřovaného kmene.

Výpočet identifikačního skóre je prováděn ze tří hodnot na bázi srovnávacího algoritmu:

- stanovení počtu signálů v referenčním spektru nejvíce se podobající spektru měřenému (≥ 1),

- stanovení počtu signálů měřeného spektra nejvíce se přibližující referenčnímu (≥ 1),
- srovnání a propočet symetrie srovnávaných párů signálů - signály měřeného a referenčního spektra (≥ 1).

Výsledné skóre je záporný dekadický logaritmus součinu těchto tří hodnot. Podle výše skóre se určuje míra pravděpodobnosti dobré identifikace (tab. 3). I velmi vysoké skóre určuje pouze pravděpodobnost, že testovaný mikroorganismus je jedním z druhů zanesených v databázi (MALDI Biotyper 3.0 uživatelský manuál Bruker Daltonics GmbH, 2011).

Tab. 3: Tabulka hodnocení spolehlivosti identifikace

Barva	Rozsah skóre	Popis
	2,300 –3,000	Druh byl s vysokou pravděpodobností identifikován
	2,000 –2,299	Rod identifikován s jistotou, druh pravděpodobně
	1,700 –1,999	Pravděpodobná identifikace rodu
	0,000 –1,699	nespolehlivá identifikace

Kromě využití pro identifikaci mikroorganismů má MALDI-TOF MS velký význam pro při analýze rezistencí mikroorganismů na antibiotika (Hrabák a kol., 2013), při analýze toxinů rovněž i v jiných oborech například v oblasti životního prostředí a potravinářství (Nenoff a kol., 2013).

2.3.9 MALDI TOF MS identifikace infekčního agens

Základním principem metody identifikace mikroorganismů je zjištění doby letu proteinů, po jejich uvolnění ze stěny buňky. Hmotnostní spektrometr generuje hmotnostní spektra, která jsou unikátní a vysoce specifická pro každý druh mikroorganismu (Croxato a kol., 2012). Hmotnostní spektrometrie je nová metoda sloužící k rychlé a kvalitní identifikaci. Výrazně zrychluje čas, od přijetí klinického materiálu do mikrobiologické laboratoře, do vydání výsledku. V případě identifikace bakterií časový rozdíl představuje 1-2 dny, v případě identifikace vláknitých hub může být rozdíl až v řádu několika týdnů (klasická identifikace u dermatofyt 3-6 týdnů).

Využití hmotnostní spektrometrie pro rutinní identifikaci infekčního agens přináší kromě rychlosti a efektivity i určité nástrahy. Pro lepší představu, příkladem těchto problémů jsou například chyby nebo nedostatky v referenčních spektrech a jejich podobnost. Příkladem podobnosti, kterou hmotnostní spektrometrie není schopna rozpoznat je např. nemožnost rozlišení *Streptococcus pneumoniae* a *Streptococcus viridans*. Dalším důvodem obtížné identifikace je přítomnost pouzdra na povrchu některých bakterií. Toto pouzdro chrání bakterii a znesnadňuje narušení buněčné stěny, tudíž komplikuje uvolnění proteinů z buňky a snižuje tak možnost dobré identifikace (Croxato a kol., 2012).

Zpracování bakteriálních druhů pomocí hmotnostní spektrometrie, je poměrně jednoduchá a rychlá metoda, která je schopna uvolnit specifické proteiny (hojně přítomné v buněčné stěně) z neporušených buněk. V případě vláknitých mikromycet je proces složitější, neboť vláknité houby jsou mnohobuněčné organismy. Mají větší a složitější molekulu než bakterie a kvasinky. V případě přímé analýzy vláknitých hub (vysoký obsah polysacharidů v buněčné stěně, hlavně chitinu, který tvoří tuhou konstrukční podporu), je velmi pravděpodobné, že spektra takto měřená hmotnostní spektrometrií mohou být v případě vláknitých hub sacharidového původu (Welham a kol., 2000). S ohledem na tyto odlišnosti je zapotřebí kmen vláknité mikromycety před vlastním měřením upravit, tzn. rozrušit buněčnou stěnu a uvolnit glykoproteiny ve spodních vrstvách buněčné stěny (Santos a kol., 2009).

Princip identifikace vláknitých hub je v podstatě stejný. Je potřeba přenést energii ze zdroje (laser) na vzorek prostřednictvím matrice tak, aby nedošlo k poškození zkoumaného kmene. Spektrum dané velikostí a nábojem uvolněných částic je, stejně jako v případě bakterií, porovnáváno s referenční databází a v případě shody je druh určen i s uvedením identifikačního skóre vyšetřovaného kmene.

Vývoj hmotnostní spektrometrie výrazně pokročil, od prvního využití MALDI-TOF MS pro analýzu lyzátu buněk v roce 1994 (Cain a kol., 1994), přes analýzu bakterie jako celku v roce 1996 (Holland a kol., 1996), až po práce zabývající se identifikací kvasinek a vláknitých hub. V roce 2010 byl uveřejněn článek kolektivu z amerického Marylandu, který se zabýval vytvořením databáze spekter kvasinek a porovnáním

194 klinických izolátů s touto databází. Při využití MALDI-TOF MS byla identifikace ve 192 (99%) případech přesná (Stevenson a kol, 2010). Další studie se zabývá testováním vláknitých hub ze skupiny dermatofytů, kdy u 285 kmenů byly srovnány různé metody identifikace (Nenoff a kol, 2013).

Firma Bruker Daltonic ve spolupráci s mykologickou laboratoří v Heidelbergu vyvinula metodu přípravy vláknitých hub pro zpracování hmotnostním spektrometrem. Rovněž vytvořila databázi spekter proteinů specifických pro jednotlivé zástupce z říše hub. Tato metoda zajišťuje stabilní fyziologický stav vláknité houby a zabraňuje procesu tvorby spor. Databáze v současné době obsahuje přibližně 40 rodů a více než 110 druhů nejčastěji se vyskytujících, lékařsky významných vláknitých patogenů. Přehled rodů vláknitých mikromycet identifikovatelných srovnáním s databází Fungi library je přiložen (příloha č.1) (MALDI Biotyper fungi library Bruker Daltonics GmbH, 2012).

3. Cíl bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce je validace metody hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF pro identifikaci lékařsky významných vláknitých hub. Porovnání této metody s klasickou identifikací prováděnou na základě hodnocení makroskopického a mikroskopického vzhledu zkoumané vláknité mikromycety. V neposlední řadě porovnávání těchto dvou metod s metodou sekvenace genomu vláknité houby. Sběr kmenů vláknitých mikromycet byl omezen na období od ledna 2013 do února 2014. U všech kmenů izolovaných v tomto období byla provedena identifikace klasickou metodou a metodou MALDI-TOF MS.

4. Praktická část

4.1 Pomůcky

4.1.1 *Materiálové a přístrojové vybavení*

Materiálové vybavení

- Očkovací jehly, kahan
- Pasteurova pipeta 3ml
- Automatická pipeta Eppendorf reference 100-1000 μ l, 10-100 μ l a 0,5-10 μ l
- Centrifugační zkumavky typu eppendorf 1,5ml
- Korkovrt
- Petriho miska (průměr 6cm)
- Podložní a krycí sklíčka

Přístrojové vybavení

- Biologický termostat BT120
- Laminární box ESCO airstream class II (Dynex)
- Třepačka Biosan OS10
- Termoblok se třepačkou Grant-bio PHMT
- Minishaker IKA MS2
- Centrifuga Eppendorf 5418
- Terčík Micro SCOUT (96 pozic)
- MALDI-TOF hmotnostní spektrometr microflexTM series

4.1.2 *Kultivační půdy*

- Sabouraudův agar (OXOID)
- Candiselect – chromogenní agar (BIO-RAD)
- Sabouraudův agar (homemade)
- Sabouraudův agar s chloramphenicolem (homemade)
- Sabouraudův agar s actidionem (homemade)

- Kultivační zkumavky - Sabouraud liquid broth, modifikovaný, 8ml (Becton Dickinson)

4.1.3 Chemikálie

- Deionizovaná voda (Sigma-Aldrich)
- Ethanol (Sigma-Aldrich)
- Acetonitril (Sigma-Aldrich)
- Kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich)
- Kyselina trifluoroctová (Sigma-Aldrich)
- Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová HCCA

4.1.4 Roztok matrice pro MALDI TOF MS stanovení

Příprava matrice se skládá ze dvou částí, a to jednak z přípravy rozpouštědla a v další fázi z rozpouštění krystalů HCCA v takto připraveném rozpouštědle.

Na vytvoření 1 ml rozpouštědla je potřeba smíchat 500 μ l 100 % acetonitrilu, 475 μ l deionizované vody a 25 μ l 100 % kyseliny trifluoroctové do zkumavky typu Eppendorf. Směs je potřeba důkladně promíchat.

Vlastní příprava matrice spočívá v naředění 2,5 mg HCCA (komerčně dodávaná zkumavka) přidáním 250 μ l předem vytvořeného rozpouštědla.

4.2 Metodika zpracování vzorků před MALDI TOF MS analýzou

4.2.1 Pracovní postup I.

Příprava kmene pro stanovení probíhá tak, že sterilní očkovací jehlou je odebrána část vykultivované vláknité houby a přenesena do zkumavky s tekutou kultivační půdou (Sabouraud liquid broth). Postupně je přeneseno dostatečné množství vláknité houby. Naočkovaná zkumavka je umístěna do třepačky a inkubována 1 - 3 dny

při 35°C nebo 27°C (podle kultivačních nároků identifikované vláknité houby) za stálého třepání. Cílem kultivace v médiu je vytvoření nárůstu vláknité houby ve formě vloček, které budou mít smáčivý povrch (Obr.20). Po ukončení kultivace je zkumavka vyjmuta ze třepačky, nechána asi 10 min. odstát, aby vločky narostlé vláknité houby sedly ke dnu zkumavky.

Následně je odsáto zhruba 1 až 1,5 ml sedimentu do zkumavky typu eppendorf a v této zkumavce je centrifugován po dobu 2 min při 14000 ot/min. Poté je odsán supernatant a následuje fáze promývání. V této fázi je k vločkám vláknité houby přidán 1 ml deionizované H₂O. Zkumavka je řádně protřepána pomocí vortexu a opět centrifugována 2 min 14000 ot/min. Fáze promývání je takto opakována dvakrát, aby došlo k úplnému odstranění tekutého kultivačního média. Na závěr je odsán supernatant a na dně zkumavky zůstanou pouze vločky vláknité houby, které slouží k dalšímu zpracování.



Obr. 20: Ukázka správného růstu vláknité houby v tekutém médiu Sabouraud liquid broth.



Obr. 21: Ukázka nesprávného růstu vláknité houby v tekutém médiu Sabouraud liquid broth.

Další fází je ethanolová extrakce, kdy je k vláknité houbě přidáno 300 μ l deionizované vody a 900 μ l etanolu. Vzorek je opět protřepán vortexováním a centrifugován po dobu 2 min při 14000 ot/min. Po odsátí supernatantu zůstane na dně zkumavky kompaktní peleta tvořená vláknitou houbou. V dalším kroku je potřeba stočenou peletu na dně zkumavky vysušit a zbavit ji tak zbytkového etanolu, což probíhá při teplotě 37°C a až do úplného vyschnutí (60-90 min. podle potřeby).

Následuje další fáze přípravy, kdy je k takto připravené peletě přidána koncentrovaná kyselina mravenčí, množství regulováno podle velikosti pelety (25 – 50 μ l). Směs je řádně protřepána pomocí vortexu a je přidáno stejné množství acetonitrilu. Následně je směs opět protřepána a centrifugována 2 min při 14000 ot/min.

Fáze vlastního zpracování vzorku na MSP terčík. Na čistou destičku je nanesen 1 μ l supernatantu vzorku a nechán zaschnout. Po zaschnutí je vzorek převrstven 1 μ l matrice a opět nechán zcela zaschnout.

Následuje měření pomocí MALDI-TOF hmotnostního spektrometru microflex™ series značky Bruker Daltonic.

Pracovní postup pro přípravu kmenů pro MALDI-TOF MS zpracování byl převzat z MALDI Biotyper fungi library Bruker Daltonics GmbH, 2012.

4.2.2 Alternativní pracovní postupy

Tento pracovní postup (postup I) se osvědčil v případě rychle rostoucích zygomycet a hyfomycet. Bohužel se neosvědčil pro stanovení dermatofytů. Na rozdíl od zygomycet a hyfomycet vyžadují odlišné kultivační podmínky a rovněž délka kultivace je odlišná. Bylo tudíž potřeba upravit metodu tak, aby odpovídala co nejvíce kultivačním nárokům dané vláknité houby. Postupně, ve snaze najít způsob zpracování dermatofytů pro analýzu, bylo vyzkoušeno několik metodik a jejich výsledky jsou shrnuty v tabulce a grafu (Tab. 4), (Graf 1). Na pohled jednoduchá metodika přímého stanovení (Alshawa a kol., 2012), kde je vynechána fáze kultivace v médiu i etanolová extrakce se neukázala jako efektivní a naměřená skóre se pohybovala hluboko pod 1,0 což je méně než nespolehlivá identifikace a do tabulky srovnání metod nebyly tyto výsledky nezahrnuty.

4.2.2.1 Pracovní postup II.

Tato metodika je pracovním postupem upraveným podle poznatků kolektivu (Theel a kol., 2011). Rozdíly oproti postupu I. spočívaly v lehce odlišné etanolové extrakci, v použití 70% kyseliny mravenčí. A další důležitou změnou oproti postupu I. byla délka kultivace ještě před zpracováním. Zatímco při zpracování vzorků metodou I. byla kultura vláknité houby 3 týdny stará, tak v této variantě byly pro úpravu vzorku využity třídenní kultury a to i v případě déle rostoucích dermatofyt. Ostatní fáze včetně měření probíhali jako v případě postupu číslo I.

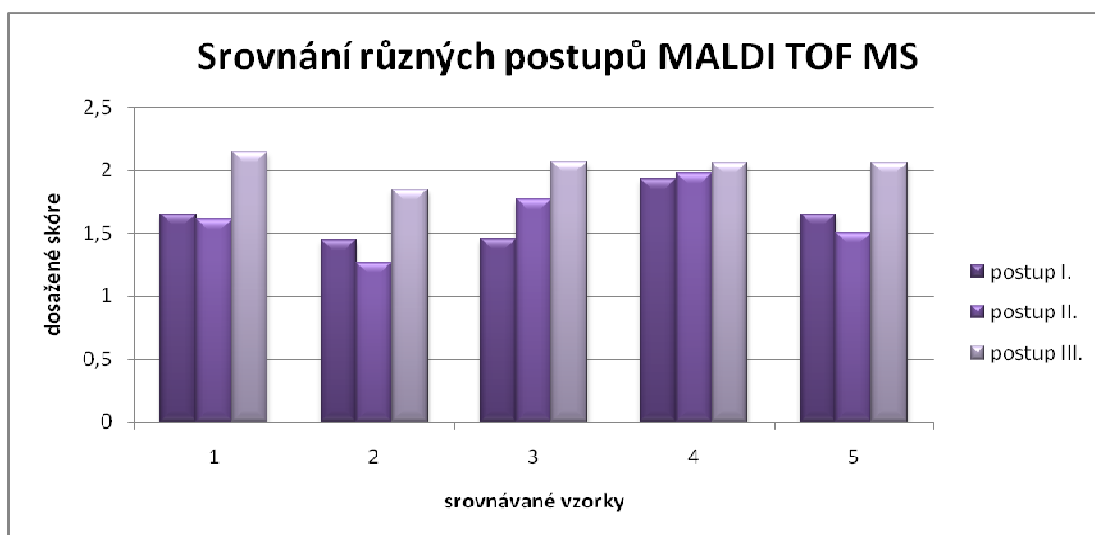
4.2.2.2 Pracovní postup III.

Tato metodika je obdobou postupu číslo I. pouze s tou úpravou, že pro kultivaci v kultivační půdě (Sabouraud liquid broth) byla použita čerstvá 3 dny stará kultura jako v případě postupu II.

4.2.3 Hodnocení použitých metod přípravy vzorků

Tab. 4: Srovnání výsledků identifikace 5 vzorků vláknitých hub rodu *Trichophyton* různými způsoby přípravy vzorků pro MALDI-TOF MS analýzu.

	Klasická ID	Pracovní postup I.		Pracovní postup II.		Pracovní postup III.	
		ID	skóre	ID	skóre	ID	skóre
1	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	1,654	<i>T. rubrum</i>	1,612	<i>T. rubrum</i>	2,149
2	<i>T.species</i>	<i>T. rubrum</i>	1,443	<i>T. rubrum</i>	1,267	<i>T. rubrum</i>	1,847
3	<i>T.species</i>	<i>T. rubrum</i>	1,451	<i>T. rubrum</i>	1,77	<i>T. rubrum</i>	2,068
4	<i>T.species</i>	<i>T. tonsurans</i>	1,93	<i>T. mentagrophytes</i>	1,974	<i>T. mentagrophytes</i>	2,063
5	<i>T. rubrum</i>	<i>T. tonsurans</i>	1,654	<i>T. Interdigitale</i>	1,502	<i>T. rubrum</i>	2,061



Graf. 1: Srovnání dosaženého skóre při MALDI-TOF MS, u 5 testovaných vzorků, při použití různých metodik přípravy kmenů vláknitých hub.

5. Výsledky a hodnocení

V rámci praktické části bylo vyšetřeno 114 kmenů vláknitých hub izolovaných z klinických materiálů v období leden 2013 až únor 2014. Z tohoto množství bylo 80 kmenů zachyceno jako původci povrchových mykóz (převážně dermatofyta) a 34 kmenů jako původci systémových a orgánových mykóz (hyalíní hyphomycety a zygomycety). Pracovní postup I. byl použit pro identifikaci hyalinních hyphomycet a zygomycet. Po prozkoušení alternativních postupů byl pro dermatofyta vybrán pracovní postup III. Přehled výsledků identifikace vláknitých mikromycet pomocí MALDI-TOF MS je rovněž rozdělen do dvou skupin dle původce. V první fázi jsou hodnoceny výsledky samotné hmotnostní spektrometrie. V další části jsou tyto výsledky porovnány s klasickou metodou identifikace. Poslední částí je srovnání obou těchto metod s metodou sekvenace.

5.1 Hodnocení výsledků MALDI TOF MS

5.1.1 Kmeny vláknitých hub vyvolávající orgánové nebo systémové mykózy

Z 34 izolátů z klinických materiálů od pacientů s orgánovými nebo systémovými mykózami byly 3 kmeny (*Mucor*, *Rhizopus* a *Rhizomucor*) ze skupiny zygomycet a ve zbylých 31 případech se jednalo o hyalinní hyfomycety – rod *Aspergillus* a *Penicillium*.

Tab. 5: Přehled o počtu a druhu jednotlivých vláknitých mikromycet určených metodou MALDI-TOF MS.

Název vláknité houby	Počet izolátů
<i>Mucor circnelloides</i>	1
<i>Rhizopus microsporus</i>	1
<i>Rhizomucor pusillus</i>	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	20
<i>Aspergillus flavus</i>	5
<i>Aspergillus niger</i>	2
<i>Aspergillus terreus</i>	1
<i>Aspergillus nidulans</i>	1
<i>Aspergillus ustus</i>	1
<i>Penicillium roqueforti</i>	1

5.1.1.1 Výsledky

Tab. 6: Přehled úspěšnosti identifikace metodou MALDI-TOF MS

Úroveň identifikace	počet vzorků
Druh byl s vysokou pravděpodobností identifikován	7
Rod identifikován s jistotou, druh pravděpodobně	19
Pravděpodobná identifikace rodu	7
Nespolehlivá identifikace	1

5.1.1.2 Hodnocení

Jak ukazuje tabulka (Tab. 6), při identifikaci kmenů vláknitých hub v případě orgánových a systémových mykóz byl u 26 kmenů určen rod i druh s vysokou pravděpodobností. V 7 případech byl rod určen pravděpodobně a pouze 1 kmen byl pomocí MALDI-TOF MS určen nespolehlivě.

5.2.1 Kmeny vláknitých hub vyvolávající povrchové mykózy

Z 80 kmenů vyvolávající povrchové mykózy bylo izolováno 70 ze skupiny dermatofytů a 10 hyalinních hyfomycet u nichž je patogenita sporná a závisí na posouzení klinických projevů. V případě izolovaných dermatofytických hub se jednalo o druhy *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton interdigitale*, *Microsporum cannis* a *Microsporum gypseum*. Zbylých 10 kmenů, kdy se mohlo jednat o patogena nebo o kontaminaci, se rozdělilo do 3 skupin. Jednalo se o rody *Scopulariopsis*, *Fusarium* a *Penicillium*. Ucelený přehled o počtu a druhu jednotlivých vláknitých mikromycet je přehledně zpracován v tabulce (Tab. 7,8)

Tab.7: Přehled druhů dermatofytických vláknitých hub určených pomocí MALDI-TOF MS

Název vláknité houby	Počet izolátů
<i>Trichophyton rubrum</i>	46
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	13
<i>Trichophyton interdigitale</i>	5
<i>Microsporum cannis</i>	5
<i>Microsporum gypseum</i>	1

Tab. 8: Přehled druhů nedermatofytických vláknitých hub určených pomocí MALDI-TOF MS

Název vláknité houby	Počet izolátů
<i>Scopulariopsis brumptii</i>	2
<i>Fusarium solani</i>	7
<i>Penicillium digitatum</i>	1

5.2.1.1 Výsledky

Výsledky identifikačního skóre při identifikaci pomocí MALDI-TOF MS u povrchových mykóz. (Tab. 9).

Tab. 9: Přehled úspěšnosti identifikace metodou MALDI-TOF MS

Úroveň identifikace	počet vzorků
Druh byl s vysokou pravděpodobností identifikován	1
Rod identifikován s jistotou, druh pravděpodobně	32
Pravděpodobná identifikace rodu	29
Nespolehlivá identifikace	18

5.2.1.2 Hodnocení

Z tabulky jasně vyplývá, že u vláknitých mikromycet, jakožto původců povrchových mykóz, byla identifikace rodu i pravděpodobnost určení druhu v 33 případech úspěšná. Ve 29 případech byla pravděpodobná identifikace rodu a v 18 případech se jednalo o nespolehlivou identifikaci.

5.3 Srovnání výsledků klasické a MALDI-TOF MS identifikace

Předchozí část se zabývala pouze vyhodnocením výsledků identifikace vláknitých hub pomocí MALDI-TOF MS. Tato část porovnává dosažené výsledky hmotnostní spektrometrie s klasickou identifikací prováděnou na základě hodnocení mikroskopického a makroskopického vzhledu testovaných kmenů. Pro porovnání byly vytvořeny následující tři kategorie:

- Shodný rod i druh,

- Shodný rod, ale odlišný druh,
- odlišný rod i druh.

5.3.1 *Kmeny vláknitých hub vyvolávající orgánové nebo systémové mykózy*

5.3.1.1 Výsledky

Tab 10: Výsledky srovnání metod klasické a MALDI-TOF MS identifikace u orgánových a systémových mykóz.

kategorie	počet vzorků	procenta
shodný rod i druh	30	88, %
shodný rod, odlišný druh	3	9%
odlišný rod i druh	1	3%

5.3.1.2 Hodnocení

Z 34 vzorků vláknitých mikromycet, došlo ve 30 případech ke shodě v určení jak v rodu tak i druhu, což je 88 % (Tab. 10). Naopak odlišnost v identifikaci rodu i druhu byla pouze v jednom případě. Klasickou identifikací byl určen *Aspergillus fumigatus*, kdežto hmotnostní spektrometrií byl tento klinický izolát určen jako *Penicillium roqueforti*, ale jednalo se však o nespolehlivou identifikaci a identifikační skóre bylo velmi nízké 1,479.

5.3.2 *Kmeny vláknitých hub vyvolávající povrchové mykózy*

Hodnocení srovnání výsledků klasické a MALDI-TOF MS identifikace vláknitých mikromycet izolovaných při diagnóze povrchových mykóz. Z 80 testovaných izolátů, ve 45 případech došlo ke shodě v rodu i druhu, ve 28 případech byl rod určen stejně, druh byl odlišný (odlišnosti v druhu jsou vyvolány faktem, že některé druhy dermatofyt byly klasickou identifikací určeny pouze jako *Trichophyton species*). Naprostá odlišnost v identifikaci rodu i druhu byla v 7 případech.

5.3.2.1 Výsledky

Tab. 11: Porovnání klasické identifikace s identifikací pomocí MALDI-TOF MS u povrchových mykóz

kategorie	počet vzorků	procenta
shodný rod i druh	45	56 %
shodný rod odlišný druh	28	35%
odlišný rod i druh	7	9%

5.3.2.2 Hodnocení

Nesoulad v identifikaci rodu i druhu (Tab. 12), byl např. když klasickou identifikací byl rod určen jako *Acremonium*, kdežto metodou hmotnostní spektrometrie byly tyto kmeny určeny jako rod *Fusarium*. Tyto rody mají makroskopický i mikroskopický vzhled velmi podobný a je těžké tyto rody odlišit. *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* (teleomorfa *Arthroderma benhamiae*) má makroskopický vzhled poměrně podobný druhu *Microsporum canis*. Posledním případem odlišné identifikace je případ, kdy klasickou metodou byl určen druh *Trichophyton rubrum* a metodou MALDI-TOF MS vyšlo *Penicillium digitatum* na velmi nízké skóre 1,128.

Tab. 12: Přehled kmenů u kterých došlo k rozdílnému určení rodu i druhu.

Klasická identifikace	MALDI-TOF MS identifikace	Skóre
<i>Microsporum species</i>	<i>Tr. mentagrophytes</i>	2,032
<i>Acremonium species</i>	<i>Fusarium solani</i>	1,72
<i>Trichophyton. rubrum</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	1,128
<i>Trichophyton species</i>	<i>Microsporum canis</i>	2,3
<i>Acremonium species</i>	<i>Fusarium solani</i>	1,349
<i>Acremonium species</i>	<i>Fusarium solani</i>	1,886
<i>Acremonium species</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	0,827

5.4 Srovnání metod klasické, MALDI-TOF MS a PCR identifikace

Porovnání těchto tří metod bylo prozatím provedeno u 15 vzorků (studie probíhající mezi Kožní klinikou FN Plzeň, Ústavem Mikrobiologie FN Plzeň a katedrou botaniky Přírodovědecké fakulty UK nadále pokračuje). Zjištěné výsledky jsou přehledně zpracovány v tabulce (Tab. 13)

Tab. 13: Srovnání klasické, MALDI-TOF MS a PCR identifikace vláknitých mikromycet.

Číslo vzorku	Lokalizace mykózy	Klasická Identifikace	MALDI TOF		PCR Identifikace
			Identifikace	skóre	
1	nehty HK	<i>Acremonium sp.</i>	<i>Fusarium solani</i>	1,72	<i>Fusarium solani</i>
2	nehty PDK	<i>Trichophyton sp.</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	1,847	<i>Trichophyton rubrum</i>
3	kůže šupiny hrud'	<i>Trichophyton sp.</i>	<i>Microsporum canis</i>	2,3	<i>Microsporum canis</i>
4	kůže šupiny nárt DK	<i>Trichophyton sp.</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	2,138	<i>Trichophyton rubrum</i>
5	kůže šupiny stehna	<i>Trichophyton sp.</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	2,167	<i>Trichophyton rubrum</i>
6	kůže šupiny LHK	<i>Trichophyton sp.</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	1,966	<i>Trichophyton rubrum</i>
7	kůže šupiny trup	<i>Trichophyton sp.</i>	<i>Tr. Interdigitale</i>	1,963	<i>Tr. mentagrophytes</i>
8	nehty LDK	<i>Acremonium sp.</i>	<i>Fusarium solani</i>	1,349	<i>Acremonium species</i>
9	nehty HK	<i>Acremonium sp.</i>	<i>Fusarium solani</i>	1,886	<i>Fusarium solani</i>
10	kůže šupiny P bérec	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1,615	<i>Trichophyton tonsurans</i>
11	kůže šupiny LHK	<i>Trichophyton sp.</i>	<i>Tr.interdigitale</i>	1,645	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
12	nehty	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	2,286	<i>Trichophyton rubrum</i>
13	nehty DK	<i>Trichophyton sp.</i>	<i>Tr.mentagrophytes</i>	1,664	<i>Tr.interdigitale</i>
14	kůže šupiny LHK	<i>Trichophyton sp.</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	1,797	<i>Trichophyton rubrum</i>
15	kůže šupiny břicho	<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum canis</i>	1,888	<i>Microsporum canis</i>

Výsledky PCR identifikace převzaty s laskavým svolením Mgr. Víta Hubky (katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta UK).

Vysvětlivky: PCR polymerázová řetězová reakce, HK horní končetina, DK dolní končetina, L levá, P pravá.

6. Diskuze

Aplikace MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie pro identifikaci rodu a druhu vláknitých mikromycet je poměrně mladá a stále se rozvíjející metoda. Na rozdíl od identifikace bakterií a kvasinek, je technicky i časově náročnější metodou. Určení bakteriálního druhu se provádí přímo, nanesením kmene na destičku, přidáním matrice a po zaschnutí je vzorek rovnou analyzován hmotnostním spektrometrem, tudíž doba identifikace se počítá v minutách. Zpracování vláknitých hub je náročné hlavně ve fázi přípravy vzorku, kultivace v tekutém mediu za neustálého třepání trvá zhruba 1 – 3 dny podle druhu houby a následné zpracování (etanolová extrakce, nanesení na destičku a změření hmotnostním spektrometrem) řádově několik hodin.

Přes nesporné výhody MALDI-TOF MS, jako je rychlost a cenová výhodnost, mohou nastat situace, kdy je identifikace neúspěšná. Při zpracování se vyskytla skupina vláknitých hub u které se objevily rozdíly v určení vláknité mikromycety klasickou a MALDI TOF MS identifikací. Odlišnosti mezi těmito dvěma způsoby identifikace mohou být dány mnoha faktory jako jsou: stáří a čistota kultury vyšetřovaného vzorku, fáze přípravy kmene pro analýzu, fáze nanášení vzorku na terčík a v neposlední řadě referenční databáze spekter.

Testování provedené na začátku prokázalo, že stáří kultury velmi výrazně ovlivňuje další manipulace se vzorkem. Z výsledků je evidentní, že lepší výsledky byly zjištěny zpracováním mladé, 3 dny staré kultury vláknité mikromycety.

Příprava vzorku před vlastním zpracováním je rovněž velmi důležitou částí. Během kultivace kmene v tekutém mediu je potřeba dodržovat kultivační podmínky optimální pro předpokládanou skupinu vláknitých hub a rovněž je potřeba udržovat obsah v neustálém pohybu. Pokud by obsah zůstal ve statické poloze vláknitá houba by vytvořila na povrchu média blanku. Cílem přípravné kultivace je získání vloček vláknité mikromycety, které budou mít smáčivý povrch. Nespecifický nárůst kmene vláknité houby v tekutém mediu snižuje kvalitu výsledného spektra a tudíž snižuje kvalitu výsledné identifikace.

Chyby vzniklé při nanášení vzorku na terčík, jsou většinou způsobené nanesením nehomogenní vrstvy.

Samotné měření odchylky a chyby nevyvolává, ale výsledná identifikace záleží na referenční databázi, konkrétně na neúplnosti databáze. Pokud vezmeme v úvahu, že námi používaná databáze obsahuje 40 rodů vláknitých hub, je zřejmé že určité procento vláknitých hub se nepodaří identifikovat. Jako příklad uvádím vzorek, který není zahrnutý v kapitole hodnocení. Jedná se o kulturu izolovanou od pacienta s povrchovou mykózou, přičemž klasickou metodou nebyl určen ani rod ani druh. Provedená hmotnostní spektrometrie rovněž nebyla úspěšná. Kmen byl určen jako *Penicillium roquerforti* s velmi nízkým identifikačním skóre 1,224. Jediným validním výsledkem získaným v případě tohoto vzorku, byla metoda PCR s následnou sekvenací provedená Mgr. Hubkou na katedře botaniky UK. Touto metodou PCR byl kmen určen jako *Arthrographis curvata*, jenž v referenční databázi spekter není obsažen.

V některých případech, i přes zdánlivě dobrou identifikaci, jsou si vláknité mikromycety příliš evolučně podobné, tzn. složení a stavba buňky příliš podobná, že výsledek s dobrým identifikačním skóre nemusí nutně znamenat dobrou identifikaci. Příkladem takovéto identifikace je velmi těsné identifikační skóre (příloha 2) u kmenů *Trichophyton rubrum* a *Trichophyton interdigitale*.

Při kultivaci sputa od pacienta s cystickou fibrózou byly izolovány dva kmeny vláknité houby rozdílného vzhledu. Jeden byl určen klasickou metodou jako *Aspergillus fumigatus* a jeho makroskopický vzhled tomuto odpovídal. Druhý izolát nebyl klasickou metodou určen, nevytvářel charakteristické znaky na mikrokultivaci a makroskopicky se jednalo o bílé mycelium. Pomocí MALDI-TOF MS byly oba tyto izoláty určeny jako *Aspergillus fumigatus* (identifikační skóre bylo 1,799 a 2,131) a jednalo se o bílou mutantní variantu tohoto druhu (Fragner, 1991).

Po provedení praktické části je zřejmé, že klasická identifikace vláknitých mikromycet je sice metoda ekonomicky výhodná (nepotřebuje speciální technické vybavení), ale kultivace je dlouhá a hodnocení je značně subjektivní a obtížné. Ze 114 testovaných kmenů se u 22 kmenů nepodařilo klasickou identifikací určit druh, ale pouze rod. Identifikace založené na metodě PCR s následnou sekvenací jsou nejjistější z

hlediska určení druhu, nicméně nejsou dostupné ve většině rutinních laboratořích. Hmotnostní spektrometrie je v porovnání s ostatními, metodou rychlou, přesnou, cenově efektivní a data tímto způsobem získaná jsou dobře reprodukovatelná. Reprodukovatelnost dat je v rutinní praxi dána hlavně standardizováním postupů kultivace a přípravy vzorků pro samotnou analýzu hmotnostním spektrometrem (Normand a kol., 2013).

Při testování 80 izolátů povrchových mykóz, byla shoda v identifikaci klasickou a MALDI-TOF MS metodou ve 45 případech (shodná identifikace druhu), což je cca 56%. U dalších 28 kmenů byl shodný pouze rod, z této skupiny bylo 19 izolátů určeno klasickou identifikací pouze jako species. Například studie (Nenoff, 2013) testovala 285 kmenů dermatofytů a uvádí shodu v identifikaci mezi klasickou metodou a metodou hmotnostní spektrometrie 78,2%.

Výsledky testování hyfomycet a zygomycet jakožto původců orgánových a systémových mykóz – shoda mezi klasickou metodou a MALDI-TOF MS byla cca 88%.

Protokol o výsledku měření hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF (příloha 3) a podrobný protokol o kvalitní analýze konkrétního izolátu vláknité houby. (Příloha 4)

7. Závěr

MALDI-TOF MS je metoda, která pro mikrobiologické laboratoře znamená průlom v diagnostice, ať se jedná o identifikaci bakterií, nebo kvasinek. Nedocenitelný přínos a pokrok však přináší do laboratoří mykologických. Identifikace vláknitých mikromycet, do této doby využívanou klasickou metodou - založenou na zhodnocení mikroskopického a makroskopického vzhledu testovaného kmene, je metodou poměrně subjektivní a závislou na míře zkušeností odečítajícího mykologa.

Oproti tomu testování pomocí MALDI-TOF MS se ukázalo jako metoda rychlá (v případě vláknitých mikromycet přibližně 3 – 5 dní), spolehlivá, poměrně jednoduchá při zpracování. Získané výsledky představují velký přínos nejen pro mykologickou laboratoř, ale zkrácení doby vydání výsledku znamená přínos hlavně pro pacienta a jeho ošetřujícího lékaře.

Vláknité mikromycety nepatří mezi nejčastější patogeny infekčních onemocnění (za 13 měsíců testování zachyceno 114 kmenů), ale jsou schopné vyvolat závažná onemocnění ohrožující i život pacienta, proto jsou nároky rychlou, efektivní a kvalitní identifikaci velmi vysoké.

MALDI-TOF MS je metoda, která toto zrychlení, zefektivnění a zkvalitnění přináší. Pomocí MALDI TOF MS se podařilo určit rod i druh u kmenů, které se klasickou metodou identifikace nepodařilo určit, nebo byl určen pouze rod. Důležitými faktory úspěšné identifikace vláknitých mikromycet jsou: důsledné dodržování fáze přípravy vzorku a aktualizace a rozšiřování spekter referenční databáze. Závěrem již jen konstatování, že je potřeba pokračovat v testování pomocí hmotnostní spektrometrie, srovnat s klasickou metodou a získat tak výsledky větší skupiny vláknitých mikromycet.

8. Seznam použitých zkratk

CLSI	Ústav pro klinické a laboratorní standardy
DBH	kyselina 2,5 – dihydroxybenzoová
ddNTP	dideoxyribonukleozidtrifosfáty
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleozidtrifosfát
EIA	enzym imuno analýza
EUCAST	Evropská komise pro testování antimikrobiální citlivosti
FerA	kyselina 4-hydroxy-3-metoxyskořicová
HABA	kyselina 2-(4-hydroxyfenylazo)benzoová
HCCA	kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová
KOH	hydroxid draselný
MALDI TOF	laserová desorpce ionizace za přítomnosti matrice s detektorem doby letu
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MS	hmotnostní spektrometrie
PCR	polymerázová řetězová reakce
SA	kyselina 3,5-dimetoxy-4-hydroxyskořicová
SAB	Sabouraud
UV	ultrafialové záření

9. Seznam zdrojů literatury

- ALSHAWA K., BERETTI JL., LACROIX C., FEUILHADE M., DAUPHIN B., QUESNE G., HASSOUNI N., NASSIF X., BOUGNOUX ME. Successful Identification of Clinical Dermatophyte and *Neoscytalidium* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. J.Clin.Microbiol. 50: 2277–2281, 2012.
- ANHALT JP., FENSELAU C. Identification of bacteria using mass spectrometry. Anal. Chem. 47: 219-225, 1975.
- CAIN TC., LUBMAN DM., WEBER WJ. Jr. Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid. Commun. Mass Spectrom. 8: 1026-1030, 1994.
- CARBONNELLE E., MESQUITA C., BILLE E., DAY N., DAUPHIN B., BERETTI J., FERRONI A., GUTMANN L., NASSIF X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. Clin.Biochem. 44: 104–109, 2011.
- CROXATO A., PROD'OM G., GREUB G. Application of MALDI TOF mass spectrometry in clinical diagnostic mikrobiology. FEMS Microbiol.Rev. 36: 380-407, 2012.
- DE HOOG GS, GUARRO J, GENE J, FIGUERAS MJ. Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Universitat Rovira i Virgili. Utrecht. Reus, 2000. ISBN 90-70351-43-9 str.1-48
- FRAGNER P., HEJTMÁNEK M. Určování dermatofytů. Universita Palackého. Olomouc, 1990. ISBN 80-7067-132-7 str.160-169.

- FRAGNER P. Určování *Aspergillů* izolovaných z lidských a zvířecích onemocnění. Česká Mykologie. 45: 113-122, 1991.
- HOLLAND RD., WILKES JG., RAFII F., SUTHERLAND JB., PERSONS CC., VOOEHEES KJ., LAY JO. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrixassisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid.Commun.Mass Spectrom. 10: 1227-1232, 1996.
- HUBKA V., MALLÁTOVÁ N. Vláknité houby z povrchu lidského těla. Živa. 3: 107-110, 2012. Dostupné z <http://www.ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/vlaknite-houby-z-povrchu-lidskeho-tela.pdf> (poslední přístup: 27.4.2014)
- HRABÁK J., CHUDÁČKOVÁ E., WALKOVÁ R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. Clin.Microbiol.Rev. 26:103-14, 2013.
- KARAS M., BACHMAN D., BAHR U., HILLENKAMP F. Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds. Int.J.mass.Spectrom.Ion. Proc. 78: 53–68, 1987.
- LARONE DH. Medically important fungi, a guide to identification. ASM Press. Washington, 1995. ISBN 1-55581-091-8 str. 91, 105-6, 121-2, 161, 185.
- MALDI Biotyper 3.0 uživatelský manuál Bruker Daltonics GmbH ©copyright 2011.
- MALDI Biotyper fungi library Bruker Daltonics GmbH ©copyright 2012.

- MALLÁTOVÁ N., HAMAL P., KOČMANOVÁ I., BUCHTA V., MENCL K. Testování citlivosti mikromycet in vitro u imunosuprimovaných pacientů – doporučení odborníků s podporou CELL a SLM ČLS JEP. Postgraduální medicína (příloha č.5). 13: 51-65, 2011.
- Microflex™ uživatelský manuál Bruker Daltonics GmbH ©copyright 2008.
- NENOFF P., ERHARD M., SIMON JC., MUYLOWA GK., HERMANN J., RATAJ W., GRÄSER Y. MALDI-TOF mass spektrometry a rapid method for the identification of dermatofyte species. *Med.Mycol.* 51: 17 – 24, 2013.
- NORKOVÁ R., JAKLOVÁ DYTRTOVÁ J., KAŠIČKA V. Ionizační techniky a rozhraní pro spojení kapilárních elektro-migračních metod s hmotnostně spektrometrickou detekcí. *Chem.Listy.* 107: 949-955, 2013.
- NORMAND AC., CASSAGNE C., RANQUE S., L'OLLIVIER C., FOURQUET P., ROESEMS S., HENDRICKX M., PIARROUX R. Assesment of various parameters to improve MALDI-TOF-MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC.Microbiology.* 13: 76, 2013. doi:10.1186/1471-2180-13-76
- OTČENÁŠEK M., SCHINDLER J., TICHÁČEK B., POTUŽNÍK V. Vyšetřovací metody při mykotických onemocněních. Avicenum. Praha, 1990. ISBN 80-201-0059-8 str. 58-75
- SANTOS C., PATERSON RRM., VENANCIO A., LIMA N. Filamentous fungal characterization by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-fly mass spektrometry. *J.appl. Microbiol.* 108: 375-385, 2009.
- SKOŘEPOVÁ M. Dermatomykologie v obrazech. Galén. Praha, 2008. ISBN 978-80-7262-465-2 str. 61-75

- SNUSTAD DP., SIMMONS MJ. Genetika. 1. MU Brno, 2009. ISBN 978-80-210-4852-2 str. 894
- STEVENSON LG., DRAKE SK., SHEA YR., ZELAZNY AM., MURRAY PR. Evaluation of matrix-asisted laser desorption ionization – time of fly mass spektrometry for identification of clinically important yeast species. J.Clin.Microbiol. 48: 3482-3486, 2010.
- ŠTURSA P., JUNKOVÁ P., STREJČEK M., MACKOVÁ M. Využití metody MALDI-TOF při identifikaci půdních mikroorganismů. Dostupné na: http://www.ekomonitor.eu/sites/default/files/soubory/Inovativni/2010/2010_stur sa_ft.pdf (Poslední přístup 27.4.2014)
- TANAKA T., WAKI H., IDO Y., AKITA S., YOSHIDA T. Protein and polymer analyse up to m/z 100,000 by laser ionization time of flight mass spektrometry. Rapid.Commun.Mass.Spectrom. 2: 151, 1988.
- THEEL ES., HALL L., MANDREKAR J., WENGENACK NL. Dermatophyte Identification Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. J.Clin.Microbiol. 49: 4067–4071, 2011.
- VOTAVA M. Lékařská mikrobiologie obecná. Neptun. Brno, 2001. ISBN 80-902896-2-2 str. 184 – 185
- VOTAVA M., ČERNOHORSKÁ L., HEROLDOVÁ M., HOLÁ V., MEJZLÍKOVÁ L., ONDROVČÍK P., RŮŽIČKA F., DVOŘÁČKOVÁ M., WOZNICOVÁ V., ZAHRADNÍČEK O. Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun. Brno, 2003. ISBN 80-902896-6-5 str. 211-233

- VOTAVA M., RŮŽIČKA F., WOZNICOVÁ V., ČERNOHORSKÁ L., DVOŘÁČKOVÁ M., DVOŘÁKOVÁ HEROLDOVÁ M., HOLÁ V., ZAHRADNÍČEK O. Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody. Neptun. Brno, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8 str. 449-460, 466-477
- WELHAM KJ., DOMIN MA., JOHNSON K., JONES L., ASHTON DS. Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid.Commun.Mass Spectrom.* 14: 307-10, 2000.
- WILLIAMS TL., ANDRZEJEWSKI D., LAY JO., MUSSER SM. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. *J.Am.Soc.Mass Spectrom.* 14: 342-351, 2003.

Internetové zdroje:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)
- www.bruker.com/maldibiotyper

10. Přílohy

Příloha 1

Seznam rodů obsažených v databázi Fungi library:

- *Acremonium*
- *Alternaria*
- *Arthrinium*
- *Aspergillus*
- *Aureobasidium*
- *Botrytis*
- *Chaetomium*
- *Chrysosporium*
- *Cladosporium*
- *Cunnighamella*
- *Curvularia*
- *Epicoccum*
- *Epidermophyton*
- *Eurotium*
- *Fenellia*
- *Fusarium*
- *Geomyces*
- *Lecythophora*
- *Lichthemia*
- *Microsporum*
- *Monilinia*
- *Mucor*
- *Paecilomyces*
- *Penicilium*
- *Pheoacremonium*
- *Phialemonium*
- *Phialophora*
- *Phoma*
- *Rhizomucor*
- *Rizopus*
- *Scedosporium*
- *Schizophyllum*
- *Scopulariopsis*
- *Scytalidium*
- *Trichoderma*
- *Trichophyton*
- *Trychurus*

Příloha 2

Analyte8



Název analytu: G10
Popis analytu:
Kód analytu:
Datum a čas vytvoření analytu: 2014-01-08T12:51:48.328Z
Použité knihovny MSP: Filamentous Fungi Library 1.0
Použitý taxonomický strom:

Hodnocení (kvalita)	Porovnaná reference	Skóre	Identifikační kód NCBI
1 (++)	Trichophyton interdigitale_CC6 DSM 12283 DSM	2.028	124925590
2 (++)	Trichophyton rubrum_CC6 DSM 4167 DSM	2.001	124925590
3 (+)	Trichophyton mentagrophytes_var_erinacei[ana] Arthroderma benhamiae[teleo]_CC6 DSM 4870 DSM	1.849	124925590
4 (+)	Trichophyton interdigitale_CC6 120227_03 ETL	1.801	124925590
5 (-)	Trichophyton interdigitale_CC6 DSM 16110 DSM	1.697	124925590
6 (-)	Trichophyton tonsurans_CC6 111201_I MVS	1.692	124925590
7 (-)	Trichophyton equinum_CC6 DSM 21688 DSM	1.691	124925590
8 (-)	Trichophyton interdigitale_CC6 F64 RLH	1.649	124925590
9 (-)	Trichophyton tonsurans_CC6 F57 LLH	1.616	124925590
10 (-)	Trichophyton tonsurans_CC6 F34 LLH	1.551	124925590

Příloha 3

Bruker Daltonik MALDI Biotyper

Výsledky klasifikace



Inf. o projektu:

Název projektu: 20130103-houby
Popis projektu:
Vlastník projektu: Administrator@FLEX-PC
Datum a čas vytvoření projektu: 2014-01-03T12:44:26.890Z
Počet analytů v projektu: 4
Typ projektu: Development
Validace: není
Pozice validace:

Přehled výsledků

Název analytu	Kód analytu	Organismus (nejlepší shoda)	Skóre	Organismus (druhá nejlepší shoda)	Skóre
<u>C4</u> (++) (A)	██████	Aspergillus fumigatus	<u>2.165</u>	Aspergillus fumigatus	<u>1.868</u>
<u>C5</u> (++) (A)	██████	Aspergillus fumigatus	<u>2.028</u>	Aspergillus fumigatus	<u>1.947</u>
<u>C6</u> (+) (B)	██████	Aspergillus fumigatus	<u>1.981</u>	nespolehlivá identifikace	<u>1.51</u>
<u>C7</u> (+) (B)	██████	Aspergillus fumigatus	<u>1.854</u>	Aspergillus fumigatus	<u>1.85</u>

Příloha 4

Analyte5



Název analytu: G7
Popis analytu:
Kód analytu: ██████████
Datum a čas vytvoření analytu: 2014-01-08T12:51:48.328Z
Použité knihovny MSP: Filamentous Fungi Library 1.0
Použitý taxonomický strom:

Hodnocení (kvalita)	Porovnaná reference	Skóre	Identifikační kód NCBI
1 (++)	Microsporum canis DSM 10708 DSM	2.161	124925590
2 (+)	Microsporum canis 120227_20 ETL	1.858	124925590
3 (+)	Microsporum canis F05_1015K_09 LLH	1.778	124925590
4 (+)	Microsporum canis 111116_20 IMD	1.755	124925590
5 (-)	Microsporum canis F06_58_11 LLH	1.473	124925590
6 (-)	Trichophyton mentagrophytes var erinacei[ana] Arthroderma benhamiae[teleo]_CC6 120227_04 ETL	1.343	124925590
7 (-)	Microsporum canis F32 LLH	1.225	124925590
8 (-)	Trichophyton interdigitale_CC6 120227_03 ETL	1.221	124925590
9 (-)	Trichophyton interdigitale_CC6 DSM 12283 DSM	1.177	124925590
10 (-)	Penicillium rugulosum DSM 19649 DSM	1.174	124925590